

**Vergleichende Untersuchungen zur
genetischen Organisation von *fkf* Genen und der Rolle von
FK506 bindenden Proteinen in Actinomyceten am Beispiel von
Streptomyceten und Mycobakterien**

vorgelegt von

Diplom-Biochemiker

Rico Berger

Vom Fachbereich 5 - Chemie
der Technischen Universität Berlin
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

Promotionsausschuß:

Vorsitzender: Prof. Dr. J. Starnik
Berichter: Priv.-Doz. Dr. U. Keller
Berichter: Prof. Dr. J. Salnikow

Tag der mündl. Prüfung: 19.11.1999

Berlin 1999

D83

Für Fleur

Abstract

Berger, Rico

Vergleichende Untersuchungen zur genetischen Organisation von *fkf* Genen und der Rolle von FK506 bindenden Proteinen in Actinomyceten am Beispiel von Streptomyceten und Mycobakterien

FK506 bindende Proteine (FKBPs) bilden neben den Cyclophilinen und Parvulinen die dritte bekannte Familie der Peptidyl-prolyl-*cis/trans*-Isomerasen (PPIasen). PPIasen katalysieren die *cis/trans*-Interkonversion von Peptidylprolylbindungen in Peptiden und Proteinen. Die Prolylisomerisierung stellt häufig den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt bei Proteinfaltungsprozessen dar. Daher wird für PPIasen eine Rolle in Prozessen wie Proteinfaltung, Proeinstabilisierung oder Proteintransport postuliert. Innerhalb der Actinomyceten sind FKBPs bisher nur aus *Streptomyces chrysomallus* und *Corynebacterium glutamicum* isoliert und charakterisiert worden. Die Funktion ist jedoch wie für andere prokaryotische FKBPs unklar.

Die Rolle der beiden FKBPs, FKBP12 und FKBP33, in Streptomyceten wurde durch gezielte Inaktivierung der *fkf* Gene in *S. coelicolor* und *S. lividans* untersucht. Dabei war es möglich eine der beiden FKBP-Domänen des membranständigen FKBP33 zu inaktivieren. Die erhaltenen Insertionsmutanten zeigten keine phänotypischen Auffälligkeiten. Dies weist darauf hin, daß das verkürzte FKBP die Funktion des intakten FKBP übernehmen kann.

Versuche FKBP33 vollständig auszuschalten blieben genau wie der Versuch FKBP12 zu inaktivieren erfolglos. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, daß die FKBPs im komplexen Lebenszyklus von Streptomyceten von essentieller Bedeutung sind.

Bei der Untersuchung der Mycobakterien, einem weiteren Genus innerhalb der Actinomyceten, wurde gefunden, daß auch schnellwachsende Spezies der Mycobakterien wie *M. smegmatis* und *M. phlei* cytosolische PPIase-Aktivität, die durch FK506 und Rapamycin inhibierbar ist, aufweisen. Dies ist besonders interessant, da bei der Recherche des Genoms der langsamwachsenden Mycobakterien wie *M. tuberculosis* und *M. leprae* festgestellt wurde, daß diese Organismen nur Cyclophiline aber keine FKBPs enthalten.

Die Klonierung des *fkf* Gens aus *M. smegmatis* ergab, daß der *fkf*-Locus von *M. smegmatis* teilweise eine ähnliche Organisation wie der von *C. glutamicum* aufweist. Das *fkfA* Gen wird konstitutiv als monocistronisches Transcript exprimiert. FKBP12 aus *M. smegmatis* ist in seinen enzymatischen Eigenschaften dem FKBP12 aus *S. chrysomallus* sehr ähnlich.

Im Rahmen der Sequenzierung des *fkf*-Genlocus von *Mycobacterium smegmatis* konnten weitere offene Leserahmen identifiziert werden, deren analoge Gene in pathogenen Mycobakterien ebenfalls nicht nachweisbar waren. Diese Gene wurden für andere Mikroorganismen bereits als stressinduzierbare Gene beschrieben. Das Fehlen derartiger Komponenten der Stressantwort bindet möglicherweise manche Mycobakterien an einen Wirt und wäre somit indirekt auch für die Pathogenität dieser Stämme mitverantwortlich. Eines dieser Gene, *phrA* codiert für eine DNA-Photolyase. Diese Proteine katalysieren in einer lichtabhängigen Reaktion die Spaltung von Thymin-dimeren in der DNA. Da für *M. smegmatis* keine Untersuchungen zur DNA-Photoreparatur vorlagen, wurde das DNA-Photoreparatursystem aus *M. smegmatis* untersucht. Die dabei beobachtete Fähigkeit lichtabhängig DNA-Schäden zu reparieren, konnte mit der Aktivität des *phrA* Genprodukts (Phr1) korreliert werden.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
As	Aminosäure
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serumalbumin)
CsA	Cyclosporin A
Cyp	Cyclophilin
Da	Dalton
DEAE-Zellulose	Diethylaminoethyl-Zellulose
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure
FKBP	FK506-bindende Proteine
Hsp	Hitzeschockprotein
IPTG	Isopropylthiogalactosid
Kan	Kanomycin
kbp	Kilobasenpaare
k_{cat}	Katalysekonstante
kDa	Kilodalton
k_{enz}	Geschwindigkeitskonstante der enzymkatalysierten <i>cis/trans</i> -Isomerisierung
K_i	Inhibitor-konstante
k_{obs}	beobachtete Geschwindigkeitskonstante
k_{un}	Geschwindigkeitskonstante der unkatalysierten <i>cis/trans</i> -Isomerisierung
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
nt	Nucleotide
ORF	offener Leserahmen (open reading frame)
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerase Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PEG	Polyethylenglycol
pI	isoelektrischer Punkt
PIPES	Piperazin-N, N'-bis-(2-ethansulfonsäure)
pNA	4-Nitroanilid
PPIase	Peptidyl-Prolyl- <i>cis/trans</i> -Isomerase
Rap	Rapamycin
rpm	Umdrehungen pro Minute
SDS	Natriumdodecylsulfat
Suc	Succinylrest
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TES	N-Tris(Hydroxymethyl) methyl-2-aminomethansulfonsäure
TRIS	Tris(Hydroxymethyl) aminomethan
XAA	beliebiger Aminoacylrest in PPIase-Substraten
YAA	beliebiger Aminoacylrest in PPIase-Substraten

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	7
1.1 Die Ordnung Actinomycetales	7
1.1.1 Mycobakterien	8
1.1.2 Streptomyceten	9
1.2 Peptidyl-Prolyl- <i>cis/trans</i> -Isomerasen	9
1.2.1 FK506 bindende Proteine (FKBPs)	11
1.2.2 Cyclophiline (Cyps)	17
1.2.3 Parvuline	20
1.3 Zielsetzung der Arbeit	23
2 Material	25
2.1 Mikroorganismen	25
2.2 Vektoren	25
2.3 Oligonukleotide und Nukleinsäuren	25
2.4 Neu konstruierte Plasmide	26
2.5 Feinchemikalien	27
2.6 Nährmedien	28
2.7 Puffer und Lösungen	30
2.8 Enzyme und Kits	31
2.9 Trägermaterialien	31
2.10 Säulenmaterialien	32
2.11 Geräte	32
3 Methoden	33
3.1 Kultivierung und Lagerung von Mikroorganismen	33
3.2 Extraktion von Nukleinsäuren	33
3.2.1 Präparation von chromosomaler DNA aus <i>Streptomyces</i>	33
3.2.2 Präparation chromosomaler DNA aus <i>M. smegmatis</i>	33
3.2.3 Isolation von gesamt RNA aus <i>M. smegmatis</i>	34
3.2.4 Plasmidpräparationen	34
3.3 DNA-Manipulationen	34
3.3.1 Agarose-Gelelektrophorese von DNA	35
3.3.2 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	35
3.4 Transformation von Mikroorganismen	35
3.4.1 Transformation von <i>E. coli</i>	35
3.4.2 Transformation von Streptomyceten	35
3.5 Transfer und Detektion von Nukleinsäuren	36
3.5.1 ³² P-Markierung von DNA-Fragmenten	36
3.5.2 Koloniehybridisierung	36
3.5.3 Southern Blot	36
3.5.4 Northern Blot	36
3.5.5 Hybridisierung und Waschbedingungen	36
3.6 „Polymerase chain reaction“ (PCR)	37
3.7 DNA-Sequenzierung	38
3.8 Gerichtete Mutagenese von Streptomyceten	39
3.8.1 Gendisruption	39

3.8.2 Genreplacement	40
3.9 Heterologe Genexpression	40
3.9.1 Expression in <i>E.coli</i>	40
3.9.2 Expression in <i>Streptomyces</i>	41
3.10 Untersuchung der DNA-Photoreparatur	41
3.11 Proteinanalytik	42
3.11.1 Zellaufschluß	42
3.11.2 Isolation von Membranen aus Streptomyceten	42
3.11.3 Proteinreinigung / Chromatographische Methoden	42
3.11.4 Proteinbestimmung	43
3.11.5 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	44
3.11.6 Western-Blot-Analyse	44
3.11.7 Messung der PPIase-Aktivität	45
3.11.8 Mesung der Photolyaseaktivität	46
4 Ergebnisse	47
4.1 Gerichtete Mutationen im <i>fkf</i> Gencluster von Streptomyceten	47
4.1.1 Disruption von <i>fkf</i> Genen in Streptomyceten	47
4.1.2 Replacement von <i>fkfA</i> und <i>fkfB</i> Streptomyceten	57
4.2 Charakterisierung eines FK506 Bindungsproteins aus <i>Mycobacterium smegmatis</i>	61
4.2.1 Isolierung einer FK506 hemmbaren PPIase aus <i>M. smegmatis</i>	61
4.3 Klonierung des <i>fkf</i> Gens aus <i>M. smegmatis</i>	66
4.4 Sequenzanalyse des <i>fkf</i> Genlocus aus <i>M. smegmatis</i>	70
4.4.1 Identifizierung des <i>fkf</i> Gens	74
4.4.2 Analyse des 5'-Bereichs von <i>fkfA</i>	75
4.4.3 Identifizierung des Gens einer hypothetischen DNA Photolyase im 3'-Bereich von <i>fkfA</i>	77
4.4.4 Untersuchung weiterer kodierender Bereiche von pMF11	79
4.5 Molekularbiologische und proteinchemische Charakterisierung von FKBP12 aus <i>M. smegmatis</i>	81
4.5.1 Heterologe Expression von <i>fkfA</i> und Charakterisierung des Genprodukts	81
4.5.2 Transkriptionelle Analyse von <i>fkfA</i>	84
4.6 Charakterisierung von <i>phrA</i> und Untersuchung der DNA-Photoreparatur in Actinomyceten	86
4.6.1 Untersuchung der DNA-Photoreparatur in <i>M. smegmatis</i>	87
4.6.2 Transkription von <i>phrA</i> in <i>M. smegmatis</i>	88
4.6.3 Heterologe Expression von <i>phrA</i> in <i>E. coli</i>	89
4.6.4 Heterologe Expression von <i>phrA</i> in <i>Streptomyces coelicolor</i>	92
5 Diskussion	96
5.1 Disruption und Replacement von <i>fkfA</i> aus Streptomyceten	96
5.2 Disruption und Replacement von <i>fkfB</i> aus Streptomyceten	98
5.3 Charakterisierung von FK506 Bindungsproteinen in Mycobakterien	99
5.4 Analyse des <i>fkf</i> Genlocus von <i>M. smegmatis</i>	100
5.4.1 Lokalisierung des Citratsynthasegens <i>citB</i>	100
5.4.2 Lokalisierung und Analyse des Gens für eine DNA-Photolyase (<i>phrA</i>)	100
5.4.3 Lokalisierung eines hypothetischen Nat-homologen ABC-Transporters	102
6 Abbildungsverzeichnis	103
7 Literaturverzeichnis	105

1 Einleitung

1.1 Die Ordnung Actinomycetales

Actinomyceten („Strahlenpilze“) sind aerobe Gram-positive Mikroorganismen, die zumeist im Boden beheimatet sind. Zu ihnen gehören Bakterien die mycelartig wachsen und Übergansformen bis hin zu den unizellulären coryneformen Bakterien und den Mycobakterien. Die mycelartig wachsenden Actinomyceten zeigen bei der Kultivierung auf einfachen Nährböden eine komplexe Differenzierung in Substratmycel und Luftmycel. Aus letzterem können sich Sporen oder Sporangien bilden. Im Gegensatz dazu wachsen Mycobakterien in Form von leicht verzweigten Zellen. Ein Überblick über die morphologischen Unterschiede innerhalb der Actinomyceten ist in Abb. 1 dargestellt.

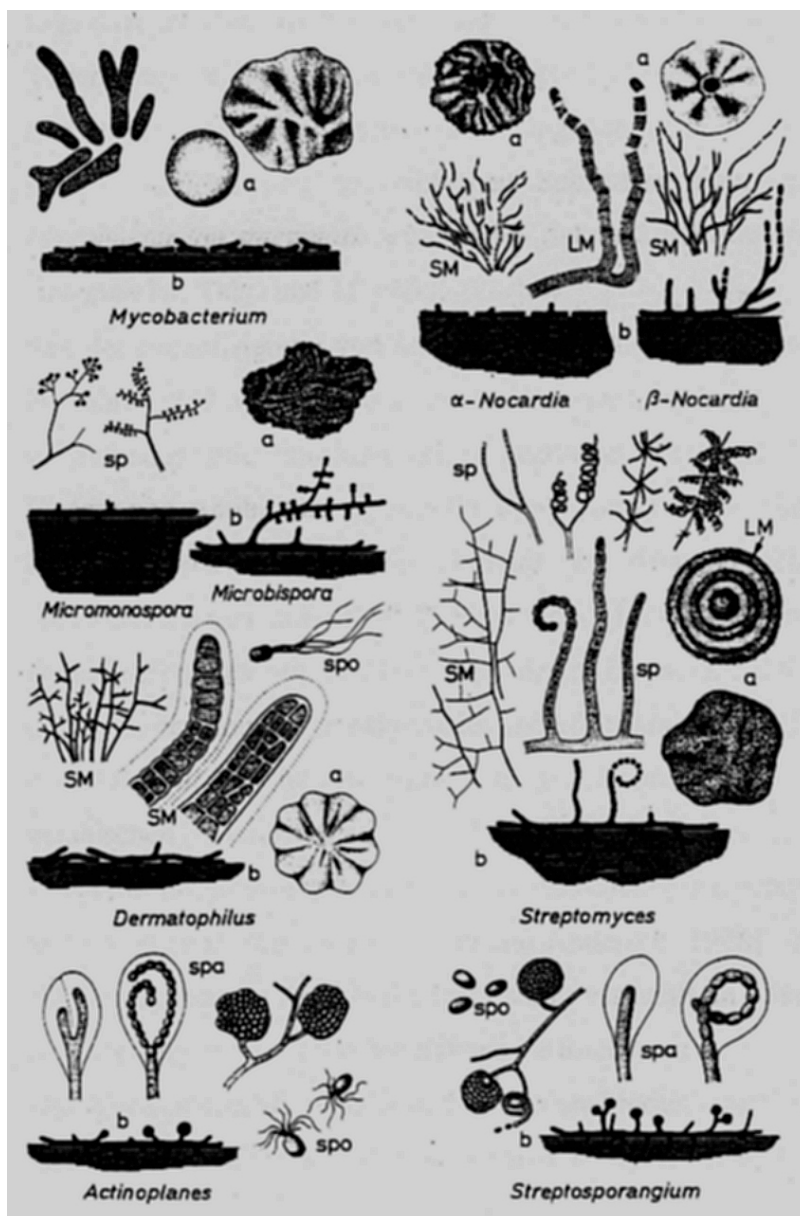


Abb. 1 Morphologische Variabilität innerhalb der Actinomyceten [aus Schlegel, 1985]

Dargestellt sind die Kolonieform (a) sowie ein Koloniequerschnitt (b). In diesem sind die typischen Differenzierungen in Substratmycel (SM), Luftmycel (LM), Sporophoren (sp), Sporangien (spa) und Sporen (spo) erkennbar.

Eine allen Actinomyceten gemeinsame Eigenschaft ist ihr hoher G+C-Gehalt in der DNA. Er liegt bei etwa 70% und erhöht sich in codierenden Abschnitten auf ca. 90% in der dritten Codonposition [Wright and Bibb, 1992]. Der G+C-Gehalt der DNA ist auch ein Merkmal zur systematischen Einordnung der Actinomyceten.

1.1.1 Mycobakterien

Die Mycobakterien sind nicht-mycelartig wachsende Vertreter der Actinomyceten. Sie besitzen als einzige langkettige Mycolsäuren in ihrer Zellwand. Dieser Umstand macht die Zellen säurestabil und dient dem Nachweis und der Klassifizierung dieser Mikroorganismen.

Die Mycobakterien werden in typische Mycobakterien und sogenannte atypische Mycobakterien unterteilt. Typische Mycobakterien sind schwerkultivierbare, langsamwachsende und oft pathogene Mikroorganismen. Dazu gehören z.B. *Mycobacterium tuberculosis* der Erreger der Tuberkulose (TBC) beim Menschen oder *M. leprae* der Lepraerreger. *M. avium* verursacht Geflügel-TBC und *M. bovis* ist der Erreger der Tuberkulose bei Rindern mit einer geringen Pathogenität auch für Menschen.

Die atypischen Mycobakterien sind hingegen zumeist apathogene Bodenbakterien, welche schnell wachsen und auf einfachen Substraten kultivierbar sind. Zu ihnen zählen u.a. *Mycobacterium smegmatis* welches bei Sekundärinfektionen in Talgdrüsen identifiziert wurde (*smegma* lat. Talg) und *M. phlei*.

Seit der Identifizierung von *M. tuberculosis* als Erreger der Tuberkulose durch Robert Koch im Jahre 1882 wird intensiv an der Bekämpfung einer der häufigsten und oftmals tödlich verlaufenden Infektionskrankheiten gearbeitet. Erst mit der Entdeckung und dem breiten Einsatz von Antibiotika konnte die hohe Mortalität der Tuberkulose zurückgedrängt werden. In den Entwicklungsländern kommt es dennoch jährlich zu etwa 200 jährlichen Neuerkrankungen auf 100.000 Einwohner. In Deutschland sind es dagegen nur etwa 20 Fälle auf 100.000 Einwohner. Dennoch zählt die Tuberkulose auch hier noch immer zu den häufigsten bakteriellen Infektionskrankheiten [Pschyrembel, 1994]. Erschwerend wirkt sich in den letzten Jahren die den Actinomyceten eigene hohe Variabilität in ihrer genetischen Konformation aus. Aufgrund genetischer Instabilitäten und fehlender DNA-Reparaturmechanismen kommt es bei pathogenen Mycobakterien vermehrt zur Bildung von multiresistenten Stämmen [Mizrahi and Andersen, 1998]. Der Einsatz der im Moment in der Klinik eingesetzten Antibiotika stößt somit vermehrt an seine Grenzen und neue Strategien zur Bekämpfung der Tuberkulose müssen verfolgt werden.

Die Verwandtschaft innerhalb der Mycobakterien erschließt zusammen mit den laufenden Genomprojekten für *M. tuberculosis* und *M. leprae* einen Genpool zur effektiven Erforschung

dieser Organismen in Hinblick auf das Auffinden neuer Wirkstoffe und Zielstrukturen bei der Infektionsbekämpfung.

1.1.2 Streptomyceten

Eine große Gruppe innerhalb der Actinomyceten stellen die apathogenen Streptomyceten dar. Im Unterschied zu allen anderen Actinomyceten enthalten sie LL-Diaminopimelinsäure anstelle von meso-Diaminopimelinsäure in ihrer Zellwand. Sie sind typische Bodenbewohner und zeigen auf Festmedium eine arttypische Differenzierung [Korn-Wendisch and Kutzner, 1992]. Als Bodenbewohner sind sie ständig einer starken Konkurrenz und wechselnden Lebensbedingungen ausgesetzt. Daraus resultieren auch die industriell und wissenschaftlich interessantesten Eigenschaften dieser Organismen:

- die Bildung einer breiten Palette von Sekundärmetaboliten
- Export von hydrolytisch wirksamen Enzymen.

Unter den Tausenden von Streptomyceten gebildeten Stoffwechselprodukten sind ca. 70% aller bekannten Antibiotika und weitere Wirkstoffe wie z.B. Immunsuppressiva [Hutchinson, 1988]. Die große Zahl der isolierten Wirkstoffe gründet sich wesentlich auf die Breite der synthetisierten Substanzklassen wie aromatische Polyketide (Actinorhodin, *S. coelicolor*), Macrolactone (FK506, *S. tsukubaensis*), β -Lactame (Cephamicine, *S. clavuligerus*), Aminoglycoside (Hygromycin, *S. hygroscopicus*), Peptide (Actinomycine, *S. chrysomallus*), Nucleoside (Puromycin, *S. alboniger*) und weitere [Gräfe, 1992].

Aufgrund der Fülle an sekundären Metaboliten und Exoproteinen spielen Streptomyceten auch eine noch nicht zu überschauende bodenökologische Rolle.

1.2 Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen

Im Gegensatz zu allen anderen proteinogenen Aminosäuren ist das Prolin eine Iminosäure. Die Verknüpfung des δ -C-Atoms der Seitenkette mit dem Amidstickstoff führt zur Ausbildung eines Pyrrolidinringes. Diese Struktur läßt nur zwei stabile Konformationen am Torsionswinkel ω zu, die *cis*-Konformation mit $\omega = 0^\circ$ und die *trans*-Konformation mit $\omega = 180^\circ$. In normalen Peptidbindungen (-CO-NH) stellt die *cis*-Konformation die energetisch ungünstigere dar und liegt zu weniger als 1% vor. Dieser Anteil erhöht sich auf 10 bis 30% in Peptidyl-Prolyl-Bindungen [Galat and Metcalfe, 1995].

Die Struktur von Prolin bewirkt eine starke Einschränkung der Konformationen des Polypeptidrückgrates. Da das Amidproton substituiert ist, ist Prolin nicht in der Lage als Wasserstoffbrücken-Donator zu fungieren. Daraus resultieren die Helix- und faltblattbrechenden Eigenschaften von Prolin.

Die in Abb. 2 dargestellte *cis/trans*-Isomerisierung ist aufgrund der hohen Aktivierungsenergie von ca. 80 kJ/mol [Fischer *et al.*, 1994] häufig der geschwindigkeitsbestimmende Schritt bei biologischen Prozessen, die unter Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerisierung ablaufen. Zu diesen Prozessen zählen die *de novo* Synthese von Proteinen und das Proteintargeting.

Der Nachweis einer Enzymkatalyse der Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerisierung gelang Fischer *et al.* [1984]. Somit war eine neue Klasse von Enzymen die Peptidyl-Prolyl-*cis/trans* Isomerasen (PPIasen) beschrieben. Diese katalysieren die *cis/trans* bzw. *trans/cis*-Isomerisierung von Peptidyl-Prolyl-Bindungen in prolinhaltigen Peptiden und Proteinen [ebd.].

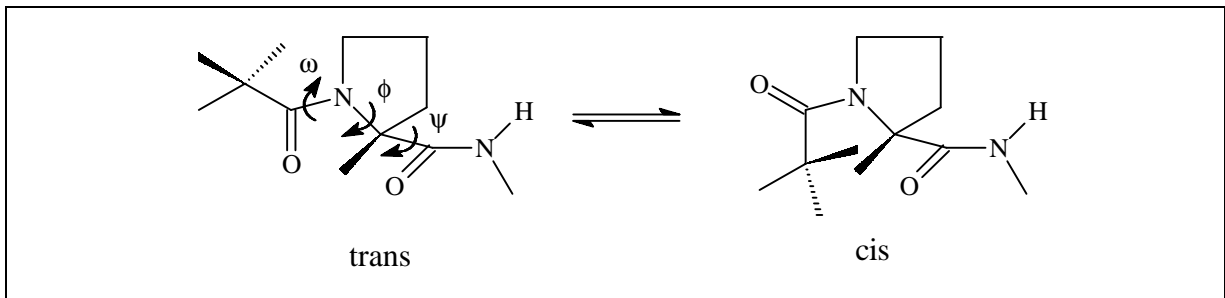


Abb. 2 Cis/trans-Isomerisierung der Peptidyl-Prolyl-Bindung

Über den Cofaktor-freien Katalysemechanismus der Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerisierung liegen keine gesicherten Ergebnisse vor.

Bisher wurden drei Familien der PPIasen beschrieben:

1. die FKBP, deren PPIase-Aktivität durch FK506 gehemmt wird,
2. die Cyclophiline, deren PPIase-Aktivität durch CyclosporinA (CsA) gehemmt wird,
3. die Parvuline, deren PPIase-Aktivität weder durch CsA noch durch FK506 gehemmt wird.

Die drei Familien weisen untereinander keine Ähnlichkeiten in ihrer Primär- und Sekundärstruktur auf. Allen drei Klassen der PPIasen ist jedoch eine auf Prolinreste ausgerichtete Bindungsaffinität gemeinsam, was als Teil der spezifischen enzymatischen Wirkung interpretiert wird [Luban, 1996].

Die Prototypen der FKBP und Cyclophilin Familie (FKBP12 und Cyp18) wurden als die intrazellulären Rezeptoren der immunsuppressiven Substanzen FK506 bzw. CsA identifiziert. Diese Substanzen sind zugleich hochwirksame Inhibitoren der PPIase-Aktivität. Aufgrund der Affinität der FKBP und Cyclophiline zu diesen Immunsuppressiva werden diese Proteine auch als Immunophiline bezeichnet. Die Strukturen dieser Immunsuppressiva sind nachfolgend dargestellt.

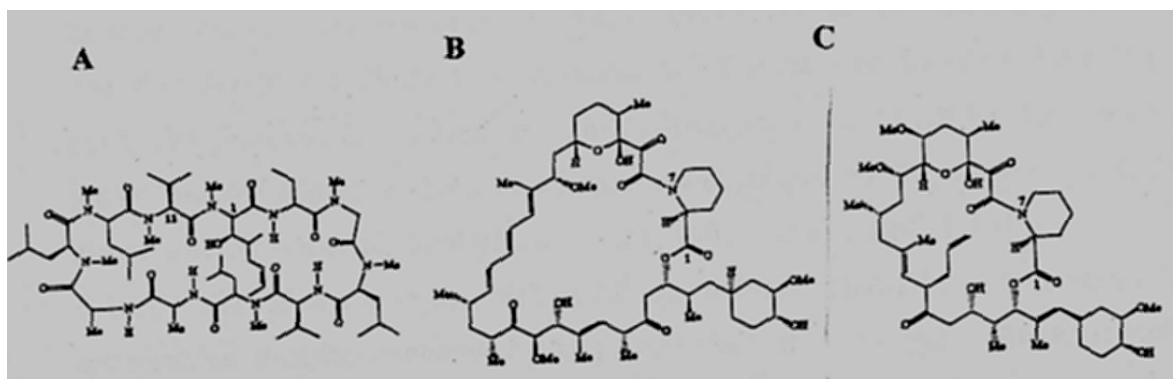


Abb. 3 PPIase-Inhibitoren / Immunsuppressiva

A CyclosporinA, B FK506, C Rapamycin

Neben den bereits erwähnten Prototypen wurden viele weitere PPIasen mit teils typischer Domänenstruktur identifiziert. Im Falle der FKBP's und Parvuline können mehrere dieser PPIase-Domänen in einem Protein enthalten sein. Zum heutigen Zeitpunkt sind jedoch keine Mischstrukturen (z.B. aus FKBP- und Parvulin-Domänen) beschrieben. Dies weist darauf hin, daß die zellulären Targets der einzelnen PPIase-Familien möglicherweise unterschiedlich sind. Weiterhin kommen PPIase-Domänen in einer Reihe von Proteinen auch in Kombination mit weiteren Domänen unterschiedlicher Funktion vor [Fischer, 1998].

1.2.1 FK506 bindende Proteine (FKBP's)

Als intrazellulärer Rezeptor für FK506, das seit 1989 klinisch angewandt wird, um Transplantatabstoßungen zu verhindern, wurde in humanen Zellen ein cytosolisches Protein mit einer Masse von 11.8 kDa und einem pI von 8.9 identifiziert [Siekierka *et al.*, 1989; Harding *et al.*, 1989]. Dieses Protein besitzt eine durch FK506 ($K_i = 1.7$ nM) und Rapamycin ($K_i = 0.2$ nM) hemmbare PPIase-Aktivität. Das FKBP12 genannte Enzym begründete die Enzymfamilie der FKBP's [Fischer, 1994].

Bei der Untersuchung des Mechanismus der durch FK506 induzierten Inhibierung der T-Zellaktivierung, wurde die Calcium/Calmodulin abhängige Serin/Threonin-Phosphatase Calcineurin als Bindungspartner des FK506/FKBP-Komplexes identifiziert [Liu *et al.*, 1991]. Durch die Bindung des FK506/FKBP-Komplexes wird die Phosphataseaktivität von Calcineurin gehemmt. Dadurch wird die cytosolische Komponente des Transkriptionsfaktor NF-AT (nuclear factor of activated T-cells) nicht dephosphoryliert und verbleibt im Cytosol. Das Interleukin-2 Gen kann nicht transkribiert werden und die Progression des T-Zell-Zyklus von $G_0 \rightarrow G_1$ kann nicht stattfinden [Schreiber and Crabtree, 1992].

Das 1975 entdeckte Macrolid Rapamycin (Rap) besitzt strukturelle Ähnlichkeit mit FK506. Es ist ebenfalls in der Lage die PPIase-Aktivität der FKBP's zu inhibieren. Die beobachtete

Immunsuppression setzt allerdings in einer späteren Phase der T-Zell-Reifung an, indem die vom IL-2 Rezeptor mediierte T-Zell-Proliferation gehemmt wird. Damit wird die Progression des T-Zellzyklus von $G_1 \rightarrow S$ gehemmt. Als Bindungspartner des FKBP/Rap Komplexes wurde FRAP, eine PI3-Kinase (FKBP12-Rapamycin associated protein, Synonyme: mTOR, RAFT1) identifiziert [Brown *et al.*, 1994; Heitman *et al.*, 1991; Sabatini *et al.*, 1994].

Neuere Untersuchungen zeigten, daß FRAP eine mitogen-stimulierbare Proteinkinase ist, die spezifisch die Proteinphosphatase PPA2 phosphoryliert. In Anwesenheit von Rapamycin wird FRAP durch den FKBP/Rap-Komplex inhibiert. Das führt zu einer Dephosphorylierung von PPA2, die hierdurch aktiviert wird. Aktivierte PPA2 dephosphoryliert nun die p70 S6 Kinase und den Transkriptionsregulator 4E-BP1, die somit inaktiviert werden [Peterson *et al.*, 1999]. Rapamycin wurde ursprünglich aufgrund seiner antifungalen Wirkung isoliert. Diese Wirkung wird in Hefe und pathogenen Pilzen wie z.B. *Cryptococcus neoformans* ebenfalls über FRAP homologe Proteine vermittelt [Heitmann *et al.*, 1991; Cruz *et al.*, 1999].

Bis heute wurden viele Vertreter der FKBP Familie charakterisiert. Ihre Größe variiert von 12 bis 52 kDa. Alle Vertreter enthalten die ca. 100 Aminosäuren umfassende PPIase-Domäne entweder einzeln, mehrfach hintereinander oder in Kombination mit anderen Domänen. Allen gemeinsam ist die durch FK506 und Rapamycin hemmbare PPIase-Aktivität. Die Analyse der Substratspezifität von FKBP in der Katalyse der *cis/trans*-Isomerisierung von Peptidyl-prolyl-Bindungen in Substraten der allgemeinen Struktur Suc-Ala-Xaa-Pro-Yaa-pNA ergab, daß FKBP nur dann die Isomerisierung effektiv katalysieren, wenn es sich bei Xaa um Leucin bzw. Phenylalanin handelt.

Die genaue zelluläre Funktion von FKBP ist noch immer unklar. Man weiß jedoch, daß FKBP mit ausgewählten Gruppen von Proteinen wechselwirken können. Dies gilt in ähnlicher Weise auch für Cyclophiline und Parvuline. Eine Beteiligung der FKBP bei Vorgängen der Proteinfaltung, des zellulären Proteintransport oder eine Funktion als Chaperone sind durch verschiedene Befunde angezeigt.

Die Funktion einiger eukaryontische Vertreter der FKBP wird im Folgenden dargestellt, weitaus weniger Informationen liegen über prokaryontische FKBP vor.

1.2.1.1 FKBP 12

Neben der Vermittlung der immunsuppressiven Wirkung von FK506 und Rapamycin wurde FKBP12 als integraler Bestandteil zweier Calciumkanäle identifiziert. So liegt FKBP12 als Komplex mit dem Inositoltriphosphatrezeptor (IP3R) vor [Timerman *et al.*, 1993]. Die Bindung des FKBP erfolgt hierbei über ein Leu-Pro Motiv [Cameron *et al.*, 1997]. Dies unterstreicht die Signifikanz der in enzymatischen Tests ermittelten Substratspezifität (vgl. 3.11.7). Bei Zugabe von FK506 dissoziiert der Komplex und der Calcium Transport wird

gehemmt [Timerman *et al.*, 1993]. Die Regulation des Calciumtransports durch den Rezeptor erfolgt unter physiologischen Bedingungen erstaunlicherweise ebenfalls durch Calcineurin. FKBP12 dient hier offenbar als Vermittler der Protein/Protein Wechselwirkung zwischen Rezeptor und Regulatorphosphatase [Cameron *et al.*, 1995]. An einen weiteren Calciumkanal, dem Ryanodinrezeptor aus Skellettmuskelzellen, bindet FKBP12 stöchiometrisch. Je ein Molekül bildet einen Komplex mit einem Rezeptorprotein [Jayaraman *et al.*, 1992]. In diesem Falle vermittelt FKBP12 möglicherweise die Interaktion und Konformation der Rezeptorproteine und ist somit für die Funktionalität des Rezeptors essentiell [Qi *et al.*, 1998]. Ob Calcineurin auch bei der Regulation des RyR1 Rezeptors eine Rolle spielt, ist nicht bekannt.

FKBP12.6 ist eine Isoform von FKBP12. FKBP12.6 hat dieselbe Anzahl an Aminosäuren, unterscheidet sich jedoch im Molekulargewicht von FKBP12 [Lam *et al.*, 1995]. Eine Genduplikation scheint der Ausgangspunkt für das Auftreten beider Isoformen im Menschen zu sein. Die Mutationen in FKBP12,6 führen zu einer veränderten Substratspezifität und so bindet FKBP12,6 selektiv nur an den Ryanodinrezeptor RyR2 der Herzmuskulatur. Die Mutation dreier Aminosäuren ist für den Wechsel der Spezifität verantwortlich [Xin *et al.*, 1999].

FKBP12 scheint weiterhin eine Funktion bei der Regulation von Rezeptoren verschiedener Wachstumsfaktoren wie dem „epidermal growth factor“ (EGF) und „tumor growth factor beta“ (TGFbeta) zu haben. In Abhängigkeit der Konzentration von FKBP12 wird die Autophosphorylierung des EGF-Rezeptors inhibiert. Setzt man in diesem Test PPIase defiziente FKBP12 Mutanten ein, unterbleibt dieser Effekt [Lopez-Illasaca *et al.*, 1998].

Die Wirkung von FKBP12 auf den TGFbeta-Rezeptor liegt in der Bindung an TbetaR1 über eine Leu-Pro Bindungsstelle. Zwar wird dabei der vollständige Rezeptor aus TbetaR1 und TbetaR2 noch ausgebildet, er bleibt jedoch inaktiv, da TbetaR2 nicht mehr in der Lage ist TbetaR1 zu phosphorylieren [Chen *et al.*, 1997].

In Hefe wurde mittels des Two Hybrid Systems die Aspartokinase als Bindungspartner von FKBP12 identifiziert. Die Aspartokinase katalysiert einen Zwischenschritt bei der Threonin- und Methioninbiosynthese, dennoch ist FKBP für die Aktivität des Enzyms nicht notwendig. FKBP12 reguliert vielmehr die „feed back“ Regulation, welche möglicherweise durch Konformationsänderungen hervorgerufen wird [Alarcón and Heitmann, 1997].

1.2.1.2 FKBP13

FKBP13 ist ein membrangebundenes Protein, welches ursprünglich im endoplasmatischen Retikulum (ER) lokalisiert wurde. Deshalb ist für FKBP13 eine Funktion als Chaperon im endoplasmatischen Retikulum und damit eine Rolle beim Transport und der Faltung von

exportierten Proteinen postuliert worden [Bush *et al.*, 1994]. Möglicherweise besteht auch in diesem Fall eine enge Kopplung mit der Funktion von Hsp70 (siehe unten) im ER [Zimmermann, 1998]. FKBP13 wurde kürzlich auch als Bindungsprotein des Cytoskeletts von roten Blutkörperchen identifiziert [Walensky *et al.*, 1998]. Da Erythrocyten jedoch kein ER enthalten ist ihre Funktion in diesen Zellen weitgehend unbekannt.

1.2.1.3 FKBP23

Wie schon für FKBP12 erwähnt, sind FKBP's nicht nur bei der Immunsuppression in Calcium-abhängige Signaltransduktionsvorgänge involviert. So wurde durch Nakamura *et al.* [1998] das ebenfalls im ER lokalisierte FKBP23 beschrieben. FKBP23 enthält neben der PPIase-Domäne zwei Calciumbindungs-motive. FKBP23 mRNA ist in allen untersuchten Geweben des menschlichen Körpers nachweisbar. Die Funktion innerhalb der Calcium-abhängigen Signaltransduktion ist jedoch noch nicht aufgeklärt.

1.2.1.4 FKBP38

Ein sehr interessanter Vertreter humaner FKBP's wurde durch Lam *et al.* [1995] beschrieben. Es handelt sich hierbei um ein FKBP, welches einen Tetratricopeptidrepeat (TRP) enthält. Das TRP-Motiv ist ein häufiges Motiv von Protein/Protein Wechselwirkungen und wurde als Hsp/FKBP-Bindungsstelle identifiziert [Goebel and Yanagida, 1991]. Man vermutet daher, daß FKBP38 wie die nachfolgend beschriebenen höhermolekularen FKBP's intrazellulär mit Hsps assoziiert ist. Zusätzlich enthält FKBP38 einen Leucin-Zipper als DNA-Bindungsmotiv. Deshalb könnte FKBP38 zusammen mit anderen Komponenten, wie z.B. Steroidrezeptoren, direkt als Transkriptionsfaktor aktiv sein. Ein analoges FKBP38 aus der Maus ist von Pedersen *et al.* [1999] als wesentlicher Bestandteil von Neuronen mit Gedächtnisfunktion beschrieben worden. Hierbei wurde gefunden, daß FKBP38 in der Lage ist Homomultimere auszubilden oder mit anderen nicht näher charakterisierten Proteinen Komplexe zu bilden. Die Bedeutung der Ausbildung derartiger Proteinkomplexe in Nervenzellen ist jedoch noch nicht geklärt.

1.2.1.5 FKBP 51/FKBP52

Wie schon für FKBP12 Funktionen in der rezeptorvermittelten Signaltransduktion nachgewiesen wurden, so wurden auch hochmolekulare Vertreter dieser Familie als Bindungspartner von Hormonrezeptoren identifiziert. Im Gegensatz zu den Rezeptoren im Fall von FKBP12 handelt es sich hierbei allerdings nicht um membranständige Rezeptoren, sondern um cytoplasmatische Steroidrezeptoren. Diese Rezeptoren gelangen nach der Bindung des Hormons über den „nuclear pore complex“ in den Zellkern und steuern dann direkt die Transkription bestimmter Gene [deFranco *et al.*, 1998].

Hormonrezeptoren bilden im Cytosol heterooligomere Proteinkomplexe. Als Teil dieser Komplexe wurden u.a. die Chaperone Hsp70 und Hsp90 sowie andere Hitzeschockproteine identifiziert. Einige dieser Proteine (humanes Hsp56, Hsp59 aus Kaninchen) zeigen Homologien zu FKBP's und sind PPIase-aktiv [Tai *et al.*, 1992; Peatty *et al.*, 1992]. Bei der Untersuchung des unligierten Progesteronrezeptors aus Hühnerovidukt wurde ein ca. 50 kDa Protein mit Affinität zu FK506 durch Renoir *et al.* [1993] beschrieben. Nachdem die FKBP-ähnlichen Proteine, die mit Hormonrezeptoren assoziiert sind, sequenziert wurden ergaben sich zwei Isoformen, die nach ihrer Molmasse FKBP51 und FKBP52 genannt werden. Beide Proteine haben ein gemeinsames Strukturmerkmal: Sie besitzen C-terminal von der PPIase-Domäne TRP-Sequenzen, die als Bindungsmotive für die Interaktion mit Hsp90 fungieren. TRP-Sequenzen wurden auch im hitzeinduzierbaren Cyclophilin40 gefunden [Duina *et al.*, 1996], welches auch Teil des untransformierten Progesteronrezeptors ist. FKBP51, FKBP52 und Cyp40 binden somit nicht direkt an den Rezeptor, sondern sind indirekt über Hsp90 mit dem Steroidrezeptor assoziiert. In allen Fällen dissoziieren die Immunophiline und Hsps nach der Hormonbindung vom Rezeptor ab. Nur in diesem Zustand wird der Rezeptor in den Zellkern transportiert [Kay, 1996].

Die Immunophiline sind somit nicht primär an der Hormonwirkung beteiligt. Ihre Rolle liegt möglicherweise in der Stabilisierung der Konformation des cytosolischen untransformierten Rezeptors. Nur diese Konformation ist in der Lage das entsprechende Hormon zu binden. Die ständige Präsenz von „hormonbindungsfähigen“ Rezeptormolekülen ist dabei die Basis für schnelle Reaktionen auf Veränderungen des Hormonspiegels.

Ein Bindungspartner des Glucocorticoidrezeptors ist die Proteinphosphatase 5. Erstaunlicherweise enthält dieses Protein auch eine PPIase Domäne (FKBP Typ) und das schon erwähnte Tetratricopeptid-Motiv [Silverstein *et al.*, 1997].

1.2.1.6 Prokaryontische FKBP's

Die ubiquitäre Verbreitung der cytosolischen FKBP's von etwa 12 kDa zeigt sich besonders in der Vielzahl der veröffentlichten Gensequenzen für Vertreter aus allen prokaryontischen Gattungen.

Dennoch gibt es Organismen wie *Bacillus subtilis* oder einige Mycobakterien die keine FKBP's enthalten [Göthel and Marahiel 1999].

E. coli enthält vier FKBP's von denen FkbA ein Mip homologes Protein (siehe unten) ist. Gemeinsam mit dem 2. periplasmatischen FKBP (PpiD) ist es an der Faltung sogenannter OMP's (outer membran proteins) beteiligt [Missiakas *et al.*, 1996; Dartigalongue and Raina 1998]. SlyD ist eine FKBP mit zusätzlicher Ni-Bindungsdomäne. Seine Funktion ist jedoch, wie die von FkbB, unbekannt [Hottenrot *et al.*, 1997].

Auch in Actinomyceten wurden Vertreter der FKBP's charakterisiert. Aus *Corynebacterium glutamicum* wurde das Gen für ein FKBP12 kloniert und sequenziert [Eikmanns *et al.*, 1994]. *Streptomyces chrysomallus* enthält ein cytosolisches FKBP12, dessen Gen mit dem Gen eines weiteren FKBP's auf dem *S. chrysomallus* Chromosom gekoppelt vorliegt. Hierbei handelt es sich um FKBP33, ein membranständiges Lipoprotein mit zwei PPIase-Domänen [Pahl and Keller, 1994]. Für FKBP33 wurde eine Funktion für den Export von Exoproteinen oder eine Rolle für die Membranintegrität vorgeschlagen. Die Funktion des FKBP12 ist wie für andere prokaryontischen Vertreter noch nicht nachgewiesen. Die Analyse eines Cosmids von *Streptomyces coelicolor* im Rahmen des *S. coelicolor* Genomprojekts zeigte ebenfalls die Anwesenheit der Gene der beiden FKBP's. Dies läßt den Schluß zu, daß die Gattung *Streptomyces*, darunter auch die FK506 produzierenden Stämme sowohl cytosolische als auch membranständige FKBP's enthalten. Interessanterweise sind auch die FKBP's aus *S. hygroscopicus* und *S. hygroscopicus* ssp. *ascomyceticus* durch FK506 und Rapamycin inhibierbar. Dies ist ein Hinweis darauf, daß diese Organismen bestimmte Mechanismen zum Schutz gegen die von ihnen selbst produzierten Wirkstoffe besitzen [Pahl and Keller, 1992]. Bisher kennt man ein aus zwei PPIase-Domänen bestehendes FKBP nur aus Streptomyceten. Das macht die Aufklärung seiner Funktion in dieser wichtigen Organismenklasse besonders interessant.

Eine Unterfamilie der prokaryontischen FKBP's bilden die MIP-Proteine (macrophage infectivity potentiator). Es sind Oberflächenproteine von intrazellulären Parasiten. Ein für die Infektiösität von *Legionella pneumophila* bedeutendes 24 kDa Oberflächenprotein konnte von Cianciotto *et al.* [1989] und Engelberg *et al.* [1989] identifiziert werden. Deletionsmutanten von *L. pneumophila* zeigten eine 80fach geringere Infektiösität. Die durch FK506 hemmbare PPIase-Aktivität dieses Proteins konnte später durch Fischer *et al.* [1992] nachgewiesen werden. Weitere MIP-Homologe wurden als Protein, als ORF oder durch Southern-Blot Hybridisierung u.a. für *Chlamydia trachomatis*, *Rochalimea quitana*, *Coxiella burnetti* und *Rickettsia* spp. beschrieben [Ludermose *et al.*, 1993, Kay 1996]. Wie das FKBP33 aus *S. chrysomallus*, so ist auch das MIP aus *C. trachomatis* ein membranständiges Lipoprotein.

Ein sehr interessanter Vertreter der FKBP's, dessen PPIase-Aktivität durch FK506 nicht hemmbar ist, wurde an der 50S Untereinheit des *E.coli* Ribosoms nachgewiesen [Stoller *et al.*, 1995].

Die PPIase am *E.coli* Ribosom ist mit dem von Guthrie und Wickner [1990] beschriebenen Triggerfaktor identisch. Der Triggerfaktor wurde aufgrund von Sequenzhomologien der Familie der FKBP's zugeordnet [Callebaut and Mornon, 1995].

Da der Triggerfaktor, im Vergleich zu allen bisher bekannten PPIasen, die Rückfaltung von RNase T1 am effektivsten zu katalysieren vermag, wird ein möglicher Zusammenhang zwischen der Triggerfaktor-Bindung am Ribosom und der Faltung neu synthetisierter Proteine diskutiert. Tatsächlich konnte für den Triggerfaktor die Bindung an die naszierende Polypeptidkette nachgewiesen werden [Hesterkamp *et al.*, 1996].

Des weiteren scheint der *E. coli* Triggerfaktor mit den Chaperonen der GroEL/GroES Familie einen Komplex auszubilden. Die Chaperone GroEL und GroES sind in *E. coli* nicht nur für die Faltung von Proteinen, sondern auch für die ClpP abhängige Proteolyse unkorrekt gefalteter Proteine verantwortlich. Der GroEL/GroES-Triggerfaktor Komplex ist für die Erkennung und zur Bindung an ungefaltete Proteine notwendig. Der Triggerfaktor vermittelt in diesem System möglicherweise die Bindung an ungefaltete Proteine (z. B. CRAG). Das Expressionslevel des Triggerfaktor scheint in diesem System der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der CRAG-Proteolyse zu sein [Kandror *et al.*, 1995].

Weitere ribosomenassoziierte FKBP's sind u.a. für *Bacillus subtilis* beschrieben [Göthel *et al.*, 1997]. Auch in Streptomyceten konnte mit Hilfe von Antikörpern gegen den *Bacillus* Triggerfaktor eine immunreaktive Bande in der entsprechenden Größe identifiziert werden [Berger and Keller, unveröffentlicht]. Die Triggerfaktoren bilden die einzige Unterklasse der FKBP's die bisher in Eukaryonten nicht nachgewiesen werden konnten [Göthel and Marahiel, 1999].

Aus den obigen Beispielen geht hervor, daß die vielen verschiedenen FKBP's jeweils spezielle oder artspezifische Funktionen ausüben. Generelle zelluläre Aufgaben lassen sich ihnen nicht zuordnen.

Da es sich bei Actinomyceten um eine biotechnologisch und medizinisch sehr interessante Organismenklasse handelt, die zudem der genetischen Analyse sehr gut zugänglich ist, wird die Untersuchung der Funktion der zwei beschriebenen FKBP's in Streptomyceten und verwandten Genera besonders attraktiv.

1.2.2 Cyclophiline (Cyps)

CyclosporinA (CsA), ein cyclische Undecapeptid aus dem Pilz *Tolypocladium inflatum* wurde aufgrund seiner antifungalen Wirkung entdeckt. Später wurde die immunsuppressive Wirkung dieser Verbindung festgestellt [Laupacis *et al.*, 1982]. Seit 1983 wird es daher zur Unterdrückung von Transplantatabstoßungen und zur Behandlung von Autoimmunkrankheiten eingesetzt.

Die Wirkung von CsA wird durch die Bindung an den cytosolischen Rezeptor CyclophilinA (CypA) vermittelt [Handschumacher *et al.*, 1984]. Fischer *et al.* [1989] bewiesen, daß

Cyclophilin und die von ihnen 1984 erstmals beschriebene PPIase identische Proteine sind. Die PPIase-Aktivität von CypA konnte durch nanomolare Mengen CsA vollständig inhibiert werden ($K_i = 2.6 \text{ nM}$).

Interessanterweise inhibiert der CypA/CsA Komplex ebenfalls Calcineurin. Dies erklärt auch die identische immunsuppressive Wirkung von FK506 und CsA, die frühe Calcium-abhängige Vorgänge der T-Zell-Proliferation inhibieren [Liu *et al.*, 1991]. Tropschug *et al.* [1989] konnten nachweisen, daß die Inhibierung der PPIase-Aktivität nicht den beschriebenen biologischen Effekt auslöst, sondern der CsA/Cyp-Komplex cytotoxisch ist. Der breite medizinische Einsatz von CsA ist jedoch aufgrund der starken Nebenwirkungen, z.B. Nephrotoxizität, limitiert. CsA bindet neben Cyps z.B. auch an das P-Glycoprotein der Niere. Dieses Protein stellt einen wesentlichen energieabhängigen Transporter von toxischen Metaboliten, Ionen und Nährstoffen dar. Dieses Protein ist daher für die Entgiftung der Niere essentiell. Durch die Bindung von CsA wird die Transportfunktion von P-Glycoprotein gehemmt, dadurch wird die Nierenfunktion stark beeinträchtigt [del Moral *et al.*, 1998].

Die Vielzahl der verschiedenen bekannten Cyclophiline zeigt die ubiquitäre Verteilung dieser Proteinfamilie in Bakterien, Pilzen, Pflanzen und Tieren an. So wurden allein acht verschiedene Cyps aus humanem Gewebe isoliert (18 kDa bis 150 kDa). Auch in Hefe gibt es acht Cyps. Alle Vertreter besitzen die ca. 130 Aminosäuren umfassende stark konservierte Cyp Domäne mit CsA hemmbarer PPIase-Aktivität.

Neben der Rolle von CypA in der Immunsuppression ist eine generelle Funktion der Cyclophiline noch nicht erkennbar. So wurde bisher kein Cyclophilin charakterisiert, daß eine essentielle Funktion im Lebenszyklus eines Organismus besitzt.

Aus diesem Grund sucht man die Bedeutung der Cyclophiline, wie auch die der FKBP, vielmehr in ihrer Beteiligung an artspezifischen, organspezifischen oder isoformspezifischen Protein/Protein Wechselwirkungen.

Ein 21 kDa Cyclophilin, CypB, ist beispielsweise im endoplasmatischen Reticulum mit dem Calciumspeicherprotein Calreticulin assoziiert. Dies kann auf eine mögliche Funktion von CypB in Calcium-abhängigen Signaltransduktionswegen hinweisen [Arber *et al.*, 1992].

In Crosslinking Experimenten wurde in Microsomen, die sich direkt vom endoplasmatischen Reticulum ableiten erneut CypB als Teil von permanenten Protein/Protein Wechselwirkungen gefunden. Hierbei stehen CypB und eine Proteindisulfidomerase in ständigem Kontakt mit sekretierten Proteinen, wie z. B. Prolactin. Bei Zugabe von CsA im μM Bereich unterbleibt die Bindung von CypB an sekretorische Proteine [Klappa *et al.*, 1995].

CypA wurden durch Luban *et al.* [1993] als Bindungspartner des gag-Polypeptids von HIV-1 (human immunodeficiency virus type 1) identifiziert. Unterbleibt die Ausbildung des

gag/CypA-Komplexes, z.B. durch konkurrierende Bindung von CsA an CypA, wird die Replikation von HIV-1 gehemmt [Franke *et al.*, 1994]. Die Bindung von CypA an gag erfolgt hierbei über eine Ala-Gly-Pro-Ile Sequenz, wobei das Prolin in der trans Konformation vorliegt [Zhao *et al.*, 1997].

Für Cyp26, dem gewebespezifischen NinaA-Protein der Augen von *Drosophila melanogaster*, konnte eine essentielle Funktion bei der Rhodopsin-Biosynthese nachgewiesen werden [Baker *et al.*, 1994]. NinaA bindet hierbei direkt an verschiedene Opsine in den Netzhautzellen von *D. melanogaster*. Zwei weitere Cyclophilinisoformen wurden in der Netzhaut von Wirbeltieren nachgewiesen. RanBP2 interagiert nicht wie NinaA direkt über die Cyclophilindomäne mit Opsinen, sondern die Cyclophilindomäne stabilisiert die Ausbildung eines Komplexes aus rot/grün Opsin und der Ran-Bindungsdomäne [Ferreira *et al.*, 1996]. Dabei kommt es möglicherweise zur Modifikation (prolyl-*cis/trans* Isomerisierung) durch die Cyclophilindomäne.

Neben den beschriebenen Protein/Protein Wechselwirkungen sind für Cyclophiline im Gegensatz zu FKBP's auch eine Vielzahl von Protein/DNA-Interaktionen beschrieben. Möglicherweise eröffnet sich auf dieser Ebene ein möglicher funktionaler Unterschied der beiden Proteinfamilien.

Das 20 kDa Cyclophilin wurde z.B. als Teil des Spliceosoms identifiziert. SnuCyp-20 formt hierbei einen Komplex mit Bindungsproteinen für snRNP (small nuclear riboproteins). Der ausgebildete Komplex ist Teil einer komplexen Maschinerie zur Entfernung von Intronsequenzen aus eukaryontischer mRNA [Teigelkamp *et al.*, 1998]. Diese Entdeckung könnte mit der *in vitro* nachweisbaren DNase Aktivität der humanen Cyclophiline A, B und C [Montague *et al.*, 1997] einen Zusammenhang bei der Regulation der Genexpression aufzeigen. Weitere auf DNA- und RNA-Ebene lokalisierte Wirkungen von Cyps sind beschrieben. So bindet SR-Cyclophilin (serin /arginin rich nuclear matrix cyclophilin) an die C-terminale Domäne der RNA Polymerase II. Das SR-Cyclophilin besitzt wie viele Splicingfaktoren eine SR-Domäne, welche für die Interaktion mit der RNA-Polymerase notwendig ist [Bourquin *et al.*, 1997].

Cyp40 wurde als negativer Regulator des c-Myb Transkriptionsfaktors in Eukaryonten beschrieben [Levenson and Ness, 1998]. Da c-Myb den Prototyp einer ganzen Klasse von Transkriptionsfaktoren mit regulierter DNA-Bindungsdomäne darstellt, könnte diese Art der Regulation, die auf eine Konformationsänderung in c-Myb zurückzuführen ist, möglicherweise eine wesentliche Funktion von Cyp40 und anderer Cyclophiline darstellen [Hunter, 1998]. Ein weiterer gut untersuchter Aspekt von Cyp40 ist die Ausbildung eines Komplexes mit Hsp90. Wie im Falle der Hsp assoziierten FKBP's erfolgt auch diese Bindung über ein Tetratricopeptid-

Motiv [Nair *et al.*, 1997]. Die Ausbildung des Komplexes wird nicht durch CsA gehemmt. Die Bindung erfolgt unabhängig von der PPIase-Domäne an der Hsp Bindungsstelle, die hohe Homologien zur bereits erwähnten Hsp90 Bindungsstelle von FKBP52 aufweist [Hofmann and Handschuhmacher, 1995]. Die Bindung des hitzeinduzierbaren Cyp40 an Steroidrezeptoren via Hsp90 (vgl. FKBP52) ist für die Regulation des Rezeptors nicht notwendig. Die Deletion von *cyp40* hat keinen Effekt auf die Lebensfähigkeit von Hefe [Warth *et al.*, 1997]. Auch alle anderen in Hefe gefundenen Immunophilinen sind einzeln oder komplett ausschaltbar, ohne daß Hefe dadurch einen letalen Defekt erleiden würde [Dolinski *et al.*, 1997].

Wie im Falle der FKBP's fehlen auch bei der Aufklärung der Rolle der Cyclophilinen in Prokaryonten experimentelle Daten. In den bisher untersuchten Organismen *E. coli*, *B. subtilis* und *Legionella pneumophila* führt das Ausschalten der Gene zu keinem sichtbaren Effekt [Kleerebezem *et al.*, 1995; Herrler *et al.*, 1994; Schmidt *et al.*, 1996].

Aus Actinomyceten wurden bisher zwei Cyclophilinen isoliert. Die beiden Proteine gehören interessanterweise verschiedenen phylogenetischen Gruppen an [Pahl *et al.*, 1997]. Die Funktion von CypB ist ungeklärt. Das Gen von CypA wird ausschließlich in der frühen Wachstumsphase des Organismus unter der Kontrolle eines ^{hrd}B spezifischen Promotors als leaderlose mRNA transkribiert. CypA könnte daher eine wichtige Rolle in der frühen Wachstumsphase von *S. chrysomallus* spielen [Berger *et al.*, 1999]. In den Genomen von *M. tuberculosis*, *M. leprae* und *S. coelicolor* lassen sich ebenfalls je zwei Cyclophilinen identifizieren. Diese gehören wie bei *S. chrysomallus* zwei verschiedenen phylogenetischen Klassen an.

1.2.3 Parvuline

Rahfeld *et al.* konnten eine neue PPIase aus *E. coli* isolieren, die keine Sequenzähnlichkeit mit FKBP und Cyp aufwies [Rahfeld *et al.*, 1994]. Sie ließ sich, im Gegensatz zu den bisher beschriebenen PPIasen, nicht durch CsA, FK506 und Rapamycin inhibieren. Aufgrund der geringen molekularen Masse von 10.1 kDa wurde das Protein Parvulin genannt (lat. *parvulus*; sehr klein). Die Strukturdaten und die Nichtinhibierbarkeit der PPIase-Aktivität führten zur Definition der dritten Familie der PPIasen [Rahfeld *et al.*, 1994].

Nachfolgend wurden sowohl eukaryontische, als auch prokaryontische Vertreter der Parvuline identifiziert. Diese sind in der Regel größer als der Parvulin-Prototyp. Meist handelt es sich um Enzyme, die neben der PPIase-Domäne noch weitere funktionale Domänen besitzen, die oftmals Funktionen in Protein/Protein Wechselwirkungen haben (z.B. WW-Domänen [Sudol *et al.*, 1995]). Die folgende Tabelle zeigt eine Aufstellung der bisher bekannten Parvuline und deren Funktion

Protein	Organismus	kDa	PPIase	2. Domäne	besondere Eigenschaften	Funktion	Quelle
Parvulin	<i>E. coli</i>	10.1	+	-		unbekannt	Rahfeld <i>et al.</i> , 1994
NifM	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	30.6	n.b.	N-terminal		Proteinsabilisierung, Stickstofffixierung	Howard <i>et al.</i> , 1986
Cbf2	<i>Campylobacter jejuni</i>	30.5	n.b.	N-terminal	20 AS Signalsequenz Lipidanker	hypothetischer Pathogenitätsfaktor	Krevella <i>et al.</i> , 1993
PrtM	<i>Lactococcus lactis</i>	33.1	+	N-terminal	20 AS Signalsequenz Lipidanker	Export von PrtP	Vos <i>et al.</i> , 1993
SurA	<i>E. coli</i>	47.3	+	PPase	20 AS Signalsequenz	essentiell, Export von „outer mebrane proteins“ (Omps)	Lazar and Kolter 1996
PrsA	<i>Bacillus subtilis</i>	32.5	+	N-terminal	20 AS Signalsequenz Lipidanker	α -Amylase-Sekretion essentiell	Jacobs <i>et al.</i> , 1993
Ptf1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	19.4	+	N-terminal WW-Domäne		essentiell für Hefe, mRNA Prozessierung	Hani <i>et al.</i> , 1999
Pin1	<i>Homo sapiens</i>	18.2	+	N-terminal WW-Domäne		essentieller Mitoseregulator	Ranganathan <i>et al.</i> , 1997
Dodo	<i>Drosophila melanogster</i>	18.3	n.b.	N-terminal WW-Domäne		unbekannt	Maleszka, 1995
Ssp1	<i>Neurospora crassa</i>	20.6	+	N-terminal WW-Domäne		unbekannt	Kops <i>et al.</i> , 1998
hEPVH	<i>Homo sapiens</i>	14.3	+	-		mitochondrial unbekannt	Rulten <i>et al.</i> , 1999
hPar14	<i>Homo sapiens</i>	14.2	+	-		unbekannt	Uchida <i>et al.</i> , 1999

Tabelle 1: Eukaryontische und prokaryontische Parvuline und deren Funktion

Im Unterschied zu den FKBP's und Cyp's konnten für Vertreter der Parvuline definierte zelluläre Funktionen aufgeklärt werden, die direkt in Proteinfaltungsprozesse eingreifen [Howard *et al.*, 1989; Vos *et al.*, 1992; Lazar and Kolter 1996; Kontinen and Sarvas, 1993]. Diese Befunde stützen damit die frühzeitig aufgestellte These, daß PPIasen an Proteinfaltungsprozessen beteiligt sind.

Auf einen besonderen Vertreter der Parvuline, der bereits unter 1.2.1.6 erwähnt wurde, soll im Folgenden näher eingegangen werden. Es handelt sich um SurA, der aus zwei Parvulin-Domänen bestehenden periplasmatischen PPIase aus *E. coli*.

Das Protein wurde in einem Screening nach Faktoren, welche das Überleben von *E. coli* in der stationären Phase ermöglichen, durch Tormo *et al.* [1990] entdeckt. Es enthält zwei Parvulin-domänen, von denen jedoch nur die C-terminale PPIase-Aktivität besitzt [Rouvière and Gross, 1996]. Ähnlich wie im FKBP33 in *S. chrysomallus* beträgt die gemessene PPIase-Aktivität nur etwa 1% in Vergleich zu den Prototypen FKBP12 bzw. Parvulin.

Insertionsmutationen in der C-terminalen PPIase-Domäne von SurA führen zu einer verminderten Überlebensfähigkeit von *E. coli* in der stationären Phase und unter Nährstoffmangel [Tormo *et al.*, 1990]. Die Mutanten zeigten Sensitivität gegen Bacitracin, Vancomycin und Gallensalze. Da *E. coli* aufgrund der Impermeabilität der äußeren Membran normalerweise gegen diese Substanzen resistent ist, war dies ein Hinweis darauf, daß SurA für die Aufrechterhaltung der Membranintegrität notwendig ist. In den SurA-Mutanten zeigte sich bei verschiedenen Membranproteinen erhöhte Sensitivität gegen Trypsin. Dies ist möglicherweise ein Hinweis auf die inkorrekte Proteinfaltung. Der Anstieg der DegP Expression in den erwähnten Mutanten wies ebenfalls auf die Zunahme von inkorrekt gefalteten Membranproteinen im Periplasma hin. Durch Expression von *surA* auf einem autonomen Plasmid konnten die Mutanten vollständig komplementiert werden. Das weist auf eine essentielle Funktion von SurA in der Faltung von Außenmembranproteinen von *E. coli* hin [Lazar and Kolter, 1996]. In einem anderen Screeningansatz wurden SurA und andere periplasmatische PPIasen tatsächlich als Komponenten der periplasmatischen Proteinfaltung nachgewiesen. Mutationen in den untersuchten Genen führten zu einer vermehrten σ^E -Aktivität. Diese wird in *E. coli* durch ungefaltete Proteine stark induziert [Missiakas *et al.*, 1996]. Die Mutationen führten jedoch nur im Falle von SurA zu einem nachweisbaren Phänotyp.

Zusätzlich scheint SurA essentiell bei der Regulation der Zellyse in der stationären Phase von *E. coli* zu sein. SurA Mutanten zeigen eine erhöhte lytische Transglycosylase-Aktivität. Es wird vermutet, daß das auf eine Deregulation des lytischen Slt-PBP7/8 und PBP3 Komplexes

in *E. coli* zurückzuführen ist. SurA sollte demnach für die Stabilisierung dieses Komplexes notwendig sein [Lazar *et al.*, 1998]

Es wurde gefunden, daß die periplasmatische PPIase PpiD aus *E. coli* in der Lage ist, SurA defiziente *E. coli* Mutanten zu supprimieren. PpiD ist eine membranassoziierte PPIase vom FKBP-Typ. Die PPIase Domäne ist im Periplasma lokalisiert und bildet dort entweder einen Komplex mit SurA oder hat ein identisches Wirkungsspektrum. Die Expression von *ppiD* wird durch den Sigmafaktor σ^{32} reguliert und ist damit ein Hitzeschockgen. Eine Mutation in *ppiD* führt ähnlich wie im Fall von *surA* zu unkorrekter Faltung von OMP's. Die Doppelmutation von *surA* und *ppiD* ist der erste beschriebene Fall für essentielle Funktionen bakterieller PPIasen [Dartigalongue and Raina, 1998].

Aufgrund der ähnlichen Domänenstruktur (N- und C-terminale PPIase-Domänen) und der Lokalisierung in Membranen wird für FKBP33 aus *S. chrysomallus* eine dem SurA oder PpiD vergleichbare Funktion vermutet. Da bisher keine weitere membranständige PPIase in Streptomyceten oder anderen Actinomyceten bekannt ist, wäre für FKBP33 auch eine Wirkung denkbar, die SurA und PpiD in *E. coli* gemeinsam bewerkstelligen. Die Funktion von SurA wäre demnach der C-terminalen Domäne von FKBP33 zuzuordnen und die Funktion von PpiD der N-terminalen Domäne. Die Untersuchung der Funktion von FKBP33 ist Teil dieser Arbeit.

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Arbeiten in der Arbeitsgruppe Keller auf dem Gebiet der Immunophilinen ergaben, daß eine Reihe von Streptomyceten wie *S. chrysomallus*, *S. lividans*, *S. coelicolor*, *S. parvulus* und auch *S. hygroscopicus* Stämme, die FK506 oder Rapamycin produzieren, zwei FKBP's enthalten. Dabei handelt es sich um ein cytosolisches FKBP12 und ein membrangebundenes FKBP33 mit zwei PPIase-Domänen.

Aufgrund der Domänenstruktur und der Lokalisierung in der Zellmembran wurde für das FKBP33 eine Funktion ähnlich der des SurA in *E. coli* postuliert. Für das cytosolische FKBP12 war wie bei anderen untersuchten Prokaryonten nichts über die Funktion bekannt.

Um die Funktion dieser Enzyme in Streptomyceten zu untersuchen, sollten die entsprechenden Gene in *S. chrysomallus*, *S. coelicolor* und *S. lividans* gezielt ausgeschaltet werden und die so erhaltenen Mutanten charakterisiert werden. In einem FKBP freien Streptomyceten sollte es zudem möglich sein, durch Affinitätschromatographie zelluläre Bindungspartner dieser Proteine zu identifizieren.

In Anbetracht der postulierten Rolle von membranassoziierten FKBP's als Pathogenitätsfaktoren, wie z.B. Mip bei *Legionella pneumophila*, war es weiterhin interessant,

die mögliche Präsenz und die Rolle von FKBP's in den verwandten Mycobakterien zu untersuchen. In dieser Familie der Actinomyceten lagen bisher nur Daten aus Sequenzierungsprojekten vor. Diese Daten wiesen für die langsamwachsenden Mycobakterien auf das Fehlen von FKBP's hin. Für die schnellwachsenden Vertreter lagen keine Untersuchungsergebnisse vor. Die Funktion der Enzyme sollte im Hinblick auf die unterschiedlichen Eigenschaften der Mycobakterien wie Pathogenität und Wachstumsgeschwindigkeit untersucht werden. Als Modellorganismus wurde für diese Untersuchungen *Mycobacterium smegmatis* gewählt, da dieser als nichtpathogener Vertreter der Mycobakterien genetisch bereits sehr gut charakterisiert ist.

2 Material

2.1 Mikroorganismen

<i>Mycobacterium smegmatis</i>	ATCC 14468
<i>Streptomyces chrysomallus</i> SC1	ATCC 11523
<i>Streptomyces lividans</i> TK64	John Innes Collection
<i>Streptomyces coelicolor</i> M154	John Innes Collection
<i>E.coli</i> DH 1	Hanahan, 1983
<i>E.coli</i> JM 109	Yanisch-Perron <i>et al.</i> 1985
<i>E.coli</i> DH5 α	Hanahan, 1983
<i>E.coli</i> M15	Qiagen, Hilden

2.2 Vektoren

pTZ18U	Mead <i>et al.</i> 1988
pSP72	Promega, Mannheim
pQE30	Qiagen, Hilden
pQE32	Qiagen, Hilden
pQE50	Qiagen, Hilden
pIJ702	Katz <i>et al.</i> 1983
pSL1180	Brosius, 1989
pGM160	Muth <i>et al.</i> 1989

2.3 Oligonukleotide und Nukleinsäuren

Lambda-DNA	BRL, Eggenstein
Sequenzierungsprimer	Amersham, Braunschweig
Universal cycle primer	5'-GTTTTCCTCCAGTCACGACGTTGTA-3'
Reverse cycle primer	5'-TTGTGAGCGGATAACAATTTC-3'

Alle PCR-Primer die im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden, sind von der Firma TIB-MOLBIOL (Berlin) synthetisiert worden. Die Sequenzen dieser Primer sind in den entsprechenden Abschnitten des Ergebnisteils dieser Arbeit aufgeführt.

2.4 Neu konstruierte Plasmide

Plasmid	Basisvektor	kloniertes Fragment	Organismus	Funktion
pAGMfk12	pGM160	internales Fragment von <i>fkBA</i> aus <i>S. chrysomallus</i>	<i>Streptomyces</i>	Disruption von <i>fkBA</i>
pAGMfk33	pGM160	internales Fragment von <i>fkBB</i> aus <i>S. chrysomallus</i>	<i>Streptomyces</i>	Disruption von <i>fkBB</i>
pGM177NS	pGM160	internales Fragment von <i>fkBA</i> aus <i>S. coelicolor</i>	<i>Streptomyces</i>	Disruption von <i>fkBA</i>
pGM390SS	pGM160	internales Fragment von <i>fkBB</i> aus <i>S. coelicolor</i>	<i>Streptomyces</i>	Disruption von <i>fkBB</i> mit intakter erster Domäne
pGM340HE	pGM160	internales Fragment von <i>fkBB</i> aus <i>S. coelicolor</i>	<i>Streptomyces</i>	Disruption von <i>fkBB</i> mit Inaktivierung der ersten Domäne
pGMPSL160	pGM160	Polylinker von pSL1180	<i>Streptomyces</i>	Kontrolle zur ektopischen Vektorintegration
pTZ33NC/A pTZ33NC/B	pTZ18U	5' und 3' Bereich von <i>fkBB</i> aus <i>S. coelicolor</i> getrennt durch <i>ErmE</i> in zwei Orientierungen	<i>E. coli DH5α</i>	Replacement von <i>fkBB</i>
pTZ12NC/A pTZ12NC/B	pTZ18U	5' und 3' Bereich von <i>fkBA</i> aus <i>S. coelicolor</i> getrennt durch <i>Aph</i> in zwei Orientierungen	<i>E. coli DH5α</i>	Replacement von <i>fkBA</i>
pSPIJ33NC/A pSPIJ33NC/B	pSPIJ002	wie pTZ33NC/A und B	<i>E. coli</i> / <i>Streptomyces</i>	Replacement von <i>fkBB</i>
pSPIJ12NC/A pSPIJ12NC/B	pSPIJ002	wie pTZ12NC/A und B	<i>E. coli</i> / <i>Streptomyces</i>	Replacement von <i>fkBA</i>
pMF150	pTZ18U	internales Fragment von <i>fkBA</i> aus <i>M. smegmatis</i>	<i>E. coli DH5α</i>	Klonierung des <i>fkB</i> Genlocus aus <i>M. smegmatis</i>
pMF11	pTZ18U	5,2 kB Fragment chromosomaler DNA aus <i>M. smegmatis</i>	<i>E. coli DH5α</i>	Sequenzierung des <i>fkB</i> Genlocus aus <i>M. smegmatis</i>
pMF21	pTZ18U	ca. 1 kB Fragment chromosomaler DNA aus <i>M. smegmatis</i>	<i>E. coli DH5α</i>	_____
pMF31	pTZ18U	5,2 kB Fragment chromosomaler DNA aus <i>M. smegmatis</i>	<i>E. coli DH5α</i>	_____
pMFFK12/3	pTZ18U	<i>fkBA</i> aus <i>M. smegmatis</i>	<i>E. coli DH5α</i>	heterologe Expression von His6-FKBP
pQEFK12/3	pQE32	<i>fkBA</i> aus <i>M. smegmatis</i>	<i>E. coli M15</i>	heterologe Expression von His6-FKBP
pMFPL1	pTZ18U	<i>phrA</i> aus <i>M. smegmatis</i>	<i>E. coli DH5α</i>	heterologe Expression von His6-PhrA
pQEPL1	pQE30	<i>phrA</i> aus <i>M. smegmatis</i>	<i>E. coli M15</i>	heterologe Expression von His6-PhrA
pQEPL50	pQE50	<i>phrA</i> aus <i>M. smegmatis</i>	<i>E. coli M15</i>	heterologe Expression von PhrA
pPLHis18	pTZ18	<i>phrA</i> aus <i>M. smegmatis</i>	<i>E. coli DH5α</i>	heterologe Expression von His6-PhrA
pPL002	pSPIJ002	<i>phrA</i> aus <i>M. smegmatis</i>	<i>E. coli</i> / <i>Streptomyces</i>	heterologe Expression von His6-PhrA

Tabelle 2: Im Rahmen dieser Arbeit konstruierte Plasmide

2.5 Feinchemikalien

Amresco, Göttingen:	Phenol
Bachem, Heidelberg:	Peptidsubstrate für PPIase-Assay
Biomol, Hamburg:	TRIS
Bristol-Meyers-Squibb, USA:	Thiostrepton
Difco, Augsburg:	Hefeextrakt
	Bacto-Trypton
	Bacto-Pepton
Gerbü, Gaiberg:	Acrylamid
Hartmann Analytik, Braunschweig:	$[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dCTP}$
	$[\alpha\text{-}^{35}\text{S}]\text{-dATP}$
Fujisawa Pharmaceutical Co., Japan:	FK506
Fluka, Neu-Ulm:	APS
	SDS
	N',N'-Methylen-bis-Acrylamid
Merck, Darmstadt:	Malzextrakt
	TES
	α -Chymotrypsin
	DMSO
Pharmacia, Freiburg:	oligo(dT)
Ridel deHaen, Seelze:	Formaldehyd (37%ig)
	Formamid
Serva, Heidelberg:	Coomassie Brilliantblau G 250 und R 250
Sigma, Deisenhofen:	Agarose
	Eichproteine für SDS-PAGE
	PEG 1000
	BSA
	Ethidiumbromid
	Cycloheximid
	CyclosporinA
	Rapamycin
	TEMED
USB, Bad Homburg:	Harnstoff

Alle Standardchemikalien, die nicht näher aufgeführt sind, wurden von den Firmen Fluka (Neu-Ulm), Sigma (Deisenhofen), Serva (Heidelberg) oder Merck (Darmstadt) bezogen.

2.6 Nährmedien

Die verwendeten Medien wurden 20 min bei 121°C sterilisiert. Zuckerhaltige Medien wurden 20 min bei 110°C autoklaviert.

Zur Herstellung von Agarplatten wurden dem Medium 1,5% Agar (Oxoid, Wesel) zugesetzt.

Bei maximal 60°C erfolgte die Zugabe der benötigten Antibiotika wie Ampicillin, Kanamycin, Thiostrepton oder weiterer Zusätze wie X-Gal.

2xYT (*E.coli* Vollmedium, [Sambrook *et al.*, 1989])

auf 1 Liter	Bacto-Trypton	16 g
	Hefeextrakt	10 g
	NaCl	5 g

HMM (CM) (Vollmedium für *S. chrysomallus* [Keller *et al.*, 1985])

auf 1 Liter	Hefeextrakt	5 g
	Malzextrakt	5 g
	Maltose	5 g

HMG (Vollmedium für *Mycobacterium smegmatis*, [DSM-Katalog, 1993, Medium 65])

auf 1 Liter	Hefeextrakt	4 g
	Malzextrakt	10 g
	Glucose	4 g
(optional)	CaCO ₃	2 g
pH-Wert mit KOH auf 7,2 eingestellt		

SOM (Minimalmedium für Streptomyceten, mit Sojamehl als C-Quelle)

auf 1 Liter:	Natriumglutamat	2,3 g
	K ₂ HPO ₄	1 g

	FE ₂ SO ₄	25 mg
	ZnSO ₄	25 mg
	CaCl ₂	25 mg
	MgCl ₂	25 mg
unmittelbar vor Benutzung		
	C-Quelle	1%

R2YE bzw R5 (Protoplasten Regenerationsmedium [Hopwood *et al.*, 1985])

auf 800 ml	Sucrose	103 g
	K ₂ SO ₄	0,25 g
	MgCl ₂ x 6H ₂ O	10,1 g
	Glucose	10 g

Je 160 ml wurden mit 3 g Agar versetzt und autoklaviert. Vor dem Gießen der Platten erfolgte die Zugabe von folgenden Lösungen zum verflüssigten Medium:

0,5%ige KH ₂ PO ₄ -Lsg.	2 ml
3,68%ige CaCl ₂ x 2 H ₂ O-Lsg.	16 ml
20%ige Prolin-Lsg.	3 ml
5,73 % TES pH 7,2	20 ml
1 M NaOH	1 ml
10%iger Hefextrakt	10 ml
Cycloheximid	1,5 ml

YEME (Flüssigmedium für *S. lividans* und *S. coelicolor* [Hopwood *et al.*, 1985])

auf 1 Liter	Hefeextrakt	3g
	Malzextrakt	3g
	Bacto-Pepton	5g
	Glucose	10g
	Sucrose	340g

pH-Wert ggf.mit KOH auf 7,2 eingestellt

Nach dem Autoklavieren bzw. unmittelbar vor Gebrauch wurde dem Medium 2,5 M MgCl₂-Lsg. bis zu einer Finalkonzentration von 0,2% zugegeben.

2.7 Puffer und Lösungen

<u>Ampicillin-Stammlösung:</u>	100 mg/ml Ampicillin (Sigma) in Wasser
<u>Kanamycin-Stammlösung:</u>	100 mg/ml Kanamycin (Sigma) in Wasser
<u>Thiostrepton-Stammlösung:</u>	50 mg/ml Thiostrepton (Bristol-Myers-Squibb) in DMSO
<u>X-Gal:</u>	2% (w/v) X-Gal (Biomol) in Dimethylformamid
<u>IPTG-Stammlösung:</u>	1 M IPTG (Biomol) in Wasser
<u>Cycloheximid-Stammlösung:</u>	1,5 g Cycloheximid; 7,5 ml Aceton; ad. 100 ml H ₂ O
<u>TE-Puffer:</u>	10 mM TRIS; 1 mM EDTA pH 8,0
<u>RNase-Stammlösung:</u>	10 mg/ml Ribonuclease aus Rinderpankreas in TE-Puffer
<u>DNA-Probenpuffer:</u>	0.25% Bromphenolblau; 0.25% Xylencyanol-FF; 50% Saccharose
<u>DNA-Extraktionspuffer</u>	TRIS; EDTA; Sucrose
<u>10 x TBE:</u>	900 mM TRIS; 900 mM Borsäure; 40 mM EDTA
<u>TBE_{sequ.}:</u>	135 mM TRIS; 131 mM Borsäure; 2.5 mM EDTA
<u>Denaturierungslösung:</u>	1 M NaOH; 1 mM EDTA
<u>Neutralisierungslösung:</u>	5 M Ammoniumacetat pH 4.6
<u>20 x SSC:</u>	3 M NaCl; 300 mM Trinatriumcitrat
<u>Southern Blot Prähybridisierungs- bzw. Hybridisierungs-Puffer:</u>	5 x SSC; 2 % (w/v) Blocking-Reagenz (Boehringer); 0.1% N-Lauroylsarkosin; 0.02% SDS 1 h bei 65°C lösen, autoklavieren
<u>Northern Blot Prähybridisierungs- bzw. Hybridisierungs-Puffer:</u>	50 mM PIPES; 100 mM NaCl; 50 mM NaPO ₄ ; 1 mM EDTA; 5% SDS; pH 6,8
<u>5 x MOPS:</u>	40 mM Natriumacetat; 5 mM EDTA; 100 mM MOPS pH 7,0
<u>Bradford-Reagenz:</u>	100 mg Coomassie Brilliant Blue G 250; 100 ml 85% (w/v) Phosphorsäure; 50 ml Ethanol; auf 1 l dest. Wasser auffüllen
<u>Bromphenolblau Lsg.:</u>	40 % Sucrose; 0,25 % Bromphenolblau
<u>SDS-Probenpuffer:</u>	1/3 Vol. Bromphenolblau Lsg.; 1/3 Vol. 10% SDS; 1/3 Vol. β-Mercaptoethanol
<u>SDS-PAGE-Laufpuffer:</u>	50 mM TRIS; 380 mM Glycin; 0,2% SDS
<u>Semi-Dry-Blotting-Puffer:</u>	25 mM TRIS pH 8,3; 192 mM Glycin; 20 % Methanol
<u>TBS:</u>	25 mM TRIS; 137 mM NaCl; pH 7,5
<u>TBS-Tween:</u>	TBS mit 0.1% (w/v) Tween 20
<u>Substratpuffer für alk. Phosphatase:</u>	

	100 mM TRIS; 100 mM NaCl; 5 mM MgCl ₂ ; pH 9,5
<u>Coomassie-Färbelösung:</u>	0,2% (w/v) Coomassie Brilliant Blau R 250; 0,05% (w/v) Coomassie Brilliant Blau G 250; 42,5% Ethanol; 5% Methanol; 10% Essigsäure
<u>Trocknerlösung:</u>	6% Glycerin; 10% Essigsäure; 40% Methanol
<u>Ponceau S:</u>	0,2% ige Ponceau S (Sigma) - Lsg. in 1% iger Essigsäure
<u>Entfärber:</u>	10 % Essigsäure; 20 % Methanol
<u>Ni-NTA Auftragspuffer:</u>	100 mM NaCl; 50 mM Natriumphosphat pH 7,8
<u>Ni-NTA Waschpuffer:</u>	100 mM NaCl; 10% Glycerin; 50 mM Natriumphosphat pH 6,0
<u>Photolyasepuffer:</u>	5 mM β -Mercaptoethanol; 1mM EDTA; 50 mM
Kaliumphosphat	pH 7,2
<u>PPIase -Meßpuffer:</u>	35 mM TRIS; pH 7,8
<u>Proteasestammlösung:</u>	α -Chymotrypsin 1 mg/ml (in Meßpuffer)
<u>PPIase-Substrate:</u>	2,3% ig in DMSO

2.8 Enzyme und Kits

Lysozym	Sigma, Deisenhofen
DNase I	Sigma, Deisenhofen
RNase aus Rinderpankreas	Boehringer, Mannheim
T4-DNA-Ligase	GIBCO BRL, Eggenstein
Restriktionsendonukleasen	GIBCO BRL, Eggenstein
Shrimp Alkaline Phosphatase	USB, Bad Homburg
Klenow-Fragment	Amersham International
Δ Taq-Cycle-Sequencing-Kit	USB, Bad Homburg
Thermo Sequenase cycle sequencing kit	Amersham International
Random-Primers DNA Labeling System	GIBCO-BRL, Eggenstein
Vent-DNA-Polymerase	New England Biolabs, Beverly
JETsorb - DNA extraction kit	GENOMED, Bad Oeynhausen
Total RNA Isolations Kit	Promega, Mannheim

2.9 Trägermaterialien

Nylon-Membran: Hybond N	Amersham, Little Chalfont
Nitrocellulose-Membran: Hybond-C extra	Amersham, Little Chalfont
PVDF-Membran	Amersham, Little Chalfont

2.10 Säulenmaterialien

DEAE-Zellulose	Whatman, Maidstone
Ni-NTA-Agarose-Resin	Qiagen, Hilden
PD-10 Columns, Sephadex [®] G-25M	Pharmacia, Freiburg
ReourceQ	Pharmacia, Freiburg
Superdex [™] 75	Pharmacia, Freiburg
Blue Sepharose	Pharmacia, Freiburg

2.11 Geräte

Agarosegelelektrophorese	Werkstatt, TU Berlin
DNA-Sequenzgelelektrophorese Modell L2	BRL, Eggenstein
Dosierpipetten	Eppendorf, Hamburg
FPLC-Apparatur	Pharmacia, Freiburg
Imaging-System Herolab E.A.S.Y. plus	Herolab, Wiesloch
Kühlzentrifuge Minifuge II	Heraeus Christ, Hanau
Kühlzentrifuge RC2-B	Sorvall, Bad Homburg
Microelisa Auto Reader	Dynatech, Denkendorf
Rotoren: GSA und SS34	Du Pont, Bad Homburg
SDS-PAGE-Mighty Small II	Hoefer Scientific, San Francisco
Semi-Dry-Blotter (FAST BLOT-Modell B34)	Biometra, Göttingen
Spektralphotometer Modell 940	Kontron, München
Thermomixer Eppendorf 5436	Eppendorf, Hamburg
Thermocycler (UNO-Thermoblock)	Biometra, Göttingen
Tischzentrifuge Eppendorf 5412	Eppendorf, Hamburg
Transilluminator Biometra TI 1	Biometra, Göttingen

3 Methoden

3.1 Kultivierung und Lagerung von Mikroorganismen

Die Kultivierung von *M. smegmatis* erfolgte in HMG-Flüssigmedium bei 37°C in einem Schüttelinkubator (250 rpm, New Brunswick G25) oder auf HMG-Agar bei 37°C. Glycerinstocks wurden aus 3 Tage alten Flüssigkulturen durch Zugabe von 1 Vol. 50% Glycerin gewonnen und bei -80°C gelagert.

E. coli-Stämme wurden in 2xYT-Medium bei 37°C kultiviert. Zur längerfristigen Lagerung wurden Übernachtskulturen mit 1 Vol. 50 % Glycerin versehen und bei -80°C eingefroren.

Flüssigkulturen von *S. lividans* und *S. coelicolor* wurden in YEME-Medium bei 30°C in Erlenmeyerkolben mit Edelstahlspirale in einem Schüttelinkubator (250 rpm, New Brunswick G25) angezogen. Zur Langzeitkonservierung wurden Sporensuspensionen (Hopwood *et al.*, 1985) mit 25% Glycerin Endkonzentration eingefroren, die dann unmittelbar zum Animpfen größerer Anzuchten eines entsprechenden Stammes geeignet sind. In Vorbereitung von Protoplastenpräparationen wurde dem Medium 0,4% Glycin zugesetzt.

3.2 Extraktion von Nukleinsäuren

3.2.1 Präparation von chromosomaler DNA aus *Streptomyces*

Die Präparation der DNA von *Streptomyces* erfolgte aus je 2 ml einer Flüssigkultur entsprechend Hopwood *et al.* [1985].

3.2.2 Präparation chromosomaler DNA aus *M. smegmatis*

Zur Präparation von chromosomaler DNA aus *M. smegmatis* wurden Zellen aus 100 ml einer 3 d alten Flüssigkultur in 50 ml Greiner-Röhrchen abzentrifugiert (20 min, 4.000 rpm, 4°C) und mit 20 ml DNA-Extraktionspuffer gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde mit 10 ml Lysozym-Lsg. (2 mg Lysozym/ml DNA-Extraktionspuffer) für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Danach wurde $\frac{1}{2}$ Vol. 0,2% SDS zugegeben und durch invertieren gründlich gemischt. Durch zweifache Extraktion der wässrigen Phase mit neutralem Phenol/Chloroform (1:1) und Zentrifugation (20 min, 5.000 rpm, 4°C) wurde die DNA gereinigt. Nach der Überführung der wässrigen Phase in 30 ml Corex-Röhrchen wurde $\frac{1}{10}$ Vol. 3M Natriumacetat pH 4.8 zugegeben und die DNA mit 0,6 Vol. Isopropanol bei RT gefällt. Nach der Zentrifugation (20 min, 11.000 rpm, 4°C) wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert und die DNA bei 37°C getrocknet. Die so erhaltene DNA wurde in 4 ml TE mindestens 24 h bei etwa 10°C gelöst.

3.2.3 Isolation von gesamt RNA aus *M. smegmatis*

Zur Isolation von RNA in kurzen Zeitintervallen wurde der total-RNA-Extraktionskit der Firma Promega verwendet und in seiner Anwendung leicht modifiziert. Zellmaterial aus 7 ml Flüssigkultur wurden sedimentiert (10 ml Corex-Röhrchen, 5 min, 10.000 rpm, 4°C) und in einem Mörser unter flüssigem Stickstoff aufgeschlossen. Entsprechend der Herstellerangabe wurde das Material in Lysepuffer überführt und in flüssigem Stickstoff eingefrohren. Nach dem Ende der Probennahme wurden alle Proben nach den Angaben des Herstellers weiterbehandelt. Zur Präparation von gesamt RNA aus *M. smegmatis* in größeren Zeitabständen und Quantitäten wurde eine Methode zur Isolation von gesamt RNA aus Pilzen verwendet [Timberlake, 1986]. Die gereinigte RNA wurde bei -80°C gelagert.

3.2.4 Plasmidpräparationen

3.2.4.1 Präparation von Plasmid-DNA aus *E.coli*

Die Isolierung von Plasmiden aus *E.coli* wurde aus einer 2 ml 2xYT-Übernachtskultur nach einem Protokoll von Morelle [1989] durchgeführt. Für Sequenzierungsansätze wurde die so erhaltene Plasmid-DNA durch eine Phenol/Chloroform (1:1) Extraktion und anschließende Ethanolfällung gereinigt. Die Lagerung erfolgte bei -20°C in TE.

3.2.4.2 Präparation von Plasmid-DNA aus Streptomyceten

Die Plasmidextraktion aus Streptomyceten erfolgte durch alkalische Lyse und Phenol/Chloroform Extraktion entsprechend Hopwood *et al.* [1985], unter Verwendung von 2 ml einer entsprechenden Flüssigkultur oder durch eine modifizierte Variante, bei der ca. 1 cm² Mycel von entsprechenden Platten als Ausgangsmaterial diente. Die Lagerung erfolgte bei 4°C in TE.

3.3 DNA-Manipulationen

Sämtliche Standardtechniken zur Manipulation von DNA und zur Transformation von Mikroorganismen wurden, wenn nicht anders beschrieben, nach Sambrook *et al.* [1989] oder Hopwood *et al.* [1985] durchgeführt. Der Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen erfolgte für mindestens eine Stunde unter den vom Hersteller angegebenen Bedingungen. Zur Dephosphorylierung von Plasmidvektor-DNA-Fragmenten wurde mit Shrimp-alkaline-phosphatase (0,5 U / 1 µg DNA) für 1 h bei 37°C gearbeitet, welche anschließend durch 30 minutiges Erhitzen auf 65°C inaktiviert wurde. Ligationsansätze wurden mit T4-DNA-Ligase bei 16°C für 10 bis 20 h inkubiert.

3.3.1 Agarose-Gelelektrophorese von DNA

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Molekülgröße wurde mit Hilfe von Horizontal-Agarose-Gelelektrophoresen und Agarosekonzentrationen zwischen 0,8% und 2% realisiert. 1xTBE diente als Elektrophoresepuffer. Es wurde eine konstante Spannung im Bereich zwischen 70 V und 100 V angelegt. Das Gel enthielt 0,5 µg/ml Ethidiumbromid, um die DNA mit einem Transilluminator oder einer UV-Handlampe detektieren zu können. Die zu analysierenden DNA-Proben wurden mit $\frac{1}{10}$ Volumen DNA-Probenpuffer versetzt und aufgetragen. Als Größenstandard diente Lambda-DNA, die zuvor mit *Pst*I behandelt wurde. Die Dokumentation der aufgetrennten und detektierten DNA-Fragmente wurde mit dem E.A.S.Y. plus - Imaging-System von Herolab durchgeführt.

3.3.2 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Nach Auftrennung eines präparativen Restriktionsansatzes wurde das entsprechende DNA-Fragment ausgeschnitten und die DNA unter Verwendung des Jetsorb-Kits (Genomed) aus der Agarose isoliert. Die so erhaltene DNA wurde ggf. mit Shrimp-Alkalischer-Phosphatase dephosphoryliert oder ohne Nachbehandlung weiterverwendet.

3.4 Transformation von Mikroorganismen

3.4.1 Transformation von *E. coli*

Zur Transformation von *E. coli* wurden kompetente Zellen nach der CaCl_2 Methode [Morrison, 1977] eingesetzt und entsprechend Sambrook *et al.* [1989] vorgegangen. Nach der Plattierung der Zellen auf antibiotikahaltige 2xYT-Agarplatten wurden resistente Kolonien identifiziert.

3.4.2 Transformation von Streptomyceten

Zur Transformation von Streptomyceten wurden Protoplasten [Hopwood *et al.*, 1985] des entsprechenden Stammes eingesetzt und nach PEG1000 Transformation [ebd.] auf R5 Agarplatten überführt. Nach ca. 16 h wurde mit dem entsprechenden Antibiotikum überschichtet. Nach 3 Tagen wurden die resistenten Kolonien auf antibiotikahaltige R5 Agarplatten vereinzelt und der weiteren Analyse zugeführt.

3.5 Transfer und Detektion von Nukleinsäueren

3.5.1 ³²P-Markierung von DNA-Fragmenten

³²P-markierte DNA-Sonden wurden mit α -[³²P]-dCTP nach der Methode von Feinberg und Vogelstein [1983] mit dem Random Primed DNA Labeling Kit (Boehringer) nach den Angaben des Anbieters hergestellt. Die so markierte DNA wurde danach mittels einer Elutip-D-Säule (Schleicher & Schuell) von nicht eingebauten Nucleotiden gereinigt.

3.5.2 Koloniehybridisierung

Im Zusammenhang mit der Klonierung von *fkfA* aus *M. smegmatis* wurden ca. 5000 *E.coli*-Klone einer Koloniehybridisierung unterzogen. Dazu wurden die etwa stecknadelkopfgroßen *E.coli* Kolonien von den selektiven 2xYT-Platten auf Nylonmembranen transferiert [Sambrook *et al.*, 1989] und mit dem internalen Fragment von pMF150 hybridisiert. Insgesamt wurde bei 3 Kolonien der insgesamt 5000 getesteten Klone ein Signal detektiert.

3.5.3 Southern Blot

Nach Restriktion und gelelektrophoretischer Auftrennung der chromosomalen- oder Plasmid-DNA wurde das entsprechende Agarosegel für 20 min mit 0,25 M HCl (Depurinisierung) behandelt, anschließend in 0,5 M NaOH; 1,5 M NaCl für 30 min (Denaturierung) und abschließend 2 x 20 min in 0,5 M TRIS; 1,5 M NaCl; pH 7,5 (Neutralisation) inkubiert. Der Transfer der DNA auf die Nylonmembran (Hybond N) fand im Saugblotverfahren (Kapillartransfer) mit 20 x SSC für 16 bis 24 h statt. Danach wurde die DNA durch UV-Crosslinking auf der Membran fixiert.

3.5.4 Northern Blot

Zur Analyse von RNA wurde die Konzentration und Integrität spektroskopisch bestimmt (A_{260} bzw. A_{260}/A_{280}). Die RNA wurde mit 1/2 Vol. StopMix (T7 Sequenzierungskit) versetzt und 15 min bei 65°C denaturiert. Identische Mengen (ca. 50 µg RNA) wurden in einem 1%igen Agarose/Formaldehyd-Gel getrennt. Nach der Behandlung mit 0,05 M NaOH und dem Äquilibrieren mit 20xSSC wurde die RNA in einem Saugblot innerhalb von ca. 16 h auf eine Nylonmembran transferiert. Das Crosslinken erfolgte analog dem Southern Blot allerdings nur für 1,5 min

3.5.5 Hybridisierung und Waschbedingungen

Alle Hybridisierungsexperimente wurden mit den unter 2.7 beschriebenen Hybridisierungspuffern, die ohne die jeweilige Sonde als Prähybridisierungspuffer dienten, durchgeführt. Die zu analysierende Nylonmembran wurde in eine Hybridisierungsröhre

(Biometra) überführt und mindestens 1 h bei 55°C-65°C (Southern Blot) oder 60°C (Northern Blot) im Rollofen prähybridisiert. Der Prähybridisierungspuffer wurde abgegossen und die unmittelbar zuvor in Hybridisierungspuffer denaturierte Sonde (10 min im kochenden Wasserbad) zugegeben. Anschließend wurde über Nacht bei der für die jeweilige Sonde ausgewählten Temperatur hybridisiert. Danach wurde die Hybridisierungslösung abgegossen und bei -20°C für weitere Experimente bereitgehalten. Nun wurde die Membran in der Röhre mit Waschpuffer (Southern: 2 x SSC, 1% SDS; Northern: 2 x SSC, 5% SDS) gespült und 2 x 30 min mit 200 ml Waschpuffer bei der gewählten Temperatur gewaschen.

Die Detektion ^{32}P -markierter Sonden erfolgte durch Autoradiographie. Dazu wurde ein Röntgenfilm (Konica NIF 100) zusammen mit der in Folie eingeschweißten Membran bei -80°C unter Verwendung einer Verstärkerfolie (Cronex, Dupont) exponiert.

Nach der Hybridisierung und Detektion wurde die Sonde von den Southern Blots entfernt. Hierzu wird die Membran zunächst gründlich mit Wasser gespült und anschließend 45 min bei 37°C in 0,2 M NaOH; 0,1% SDS-Lsg. inkubiert. Anschließend wurde die Membran mehrmals mit 2 x SSC gewaschen und direkt im Anschluß wieder für eine neue Hybridisierung eingesetzt oder bei 4°C in TE gelagert.

3.6 „Polymerase chain reaction“ (PCR)

Die PCR diente in der vorliegenden Arbeit der Amplifikation eines internen Fragmentes des *fkbA* Gens aus *M. smegmatis* und im weiteren Verlauf zur Generierung von Erkennungssequenzen bestimmter Restriktionsendonukleasen.

Die PCR-Reaktionen wurden wie folgt angesetzt:

Template-DNA	
Plasmid- oder Cosmid-DNA	100 bis 200 ng
chromosomale DNA	300 ng
Primer	je 50 pmol
dNTP's	200 µM
Vent Polymerase Puffer (10x)	10 µl
DMSO	10µl
MgSO ₄	2 mM
Vent Polymerase	2 U
dest. Wasser	
Gesamtvolumen	100µl

Zur vollständigen Denaturierung der eingesetzten G+C reichen DNA vor dem ersten Zyklus, wurde ein „Hot Start“ (6 min bei 95°C) durchgeführt. Danach wurde der Ansatz auf Eis abgekühlt, die Polymerase zupipettiert und mit der eigentlichen PCR begonnen. Das PCR-

Produkt wurde durch Agarosegelelektrophorese, mit anschließender Elution aus dem Gel, gereinigt. Die Bedingungen der PCR waren wenn nicht anders angegeben Denaturierung 1,5 min 95°C, Anlagerung 1,5 min 55°C und Polymerisierung 2 min 72°C. Abweichende PCR Bedingungen sind in den entsprechenden Abschnitten unter 4 aufgeführt.

3.7 DNA-Sequenzierung

Die zur Sequenzierung einzusetzenden DNA-Fragmente wurden alle in den Phagemidvektor pTZ18U kloniert. Dadurch konnten für die Sequenzierungsreaktionen die handelsüblichen Universal cycle- bzw. Reverse cycle Primer (2.3) eingesetzt werden.

Die Bestimmung der Nukleotidsequenzen wurde mit dem „Thermo Sequenase cycle sequencing kit“ (USB-Amersham, Bad Homburg) durchgeführt. [α -³⁵S]-dATP diente dabei zur Markierung der entstehenden DNA-Fragmente. Plasmid-DNA wurde wie unter 3.2.4.1 beschrieben gereinigt und unmittelbar vor der Sequenzierungsreaktion alkalisch denaturiert. 500 bis 1000 ng wurden als Template eingesetzt. Die Sequenzierungsvorschrift des Herstellers wurde durch Zugabe von DMSO (5 % im Reaktionsansatz) modifiziert.

Die elektrophoretische Auftrennung, der während der Sequenzreaktion entstandenen DNA-Fragmente, erfolgte nach 10 minütiger Denaturierung bei 70°C bei 60 W auf einem 6%igen Polyacrylamidgel (6% Acrylamid; 0,33% Bisacrylamid; 8M Harnstoff, 0,1 % APS; 0,072 % TEMED; in TBE_{Sequ.}).

Das Gel wurde zwischen zwei durch 0,04 mm starke Abstandhalter (Gel-Blotting-Papier GB002, Schleicher & Schuell) getrennte Glasplatten gegossen. Eine Platte wurde zuvor mit „Bindesilan“ (Pharmacia) und die andere mit „Repelsilan“ (Pharmacia) behandelt. Dadurch blieb das Gel nach der Elektrophorese auf der mit „Bindesilan“ behandelten Platte haften und alle weiteren Schritte wie das Fixieren (15 min in 10% Methanol; 15% Essigsäure), Waschen 30 min, Trocknen (55°C mind. 3h) sowie die abschließende Autoradiographie (Röntgenfilm Konica. NIF 100) konnten so direkt auf dem fixierten Gel durchgeführt werden.

Die Auswertung der ermittelten Nukleotidsequenzen erfolgte mit Hilfe des Programmes PC/Gene [Version 6.70, 1992; Moore *et al.*, 1988]. Für die Analyse des G+C-Gehaltes der DNA und die Identifizierung offener Leserahmen anhand des Actinomyceten typischen Codongebrauches wurde FRAME [Bibb *et al.*, 1984] sowie CODING 2 (programmiert von F. Schauwecker 1997 auf der Grundlage von 17 *Streptomyces*-Genen mit 5212 Codons) verwendet. Die Datenbankrecherchen wurden mit FASTA [Pearson and Lipman, 1988] oder Blast [Altschul *et al.*, 1997] und den jeweils aktuellen Versionen der Datenbanken von SWISSPROT und EMBL ausgeführt. Zur Erstellung und Darstellung der Sequenzvergleiche

dienten die Programme CLUSTAL W [Thompson *et al.*, 1994] und GeneDoc [Nicolas and Nicolas, 1997].

3.8 Gerichtete Mutagenese von Streptomyceten

3.8.1 Gendisruption

Zur gezielten Manipulation von *fkf* Genen, wurde der Vektor pGM160 verwendet [Muth *et al.*, 1989]. Dieser Vektor besitzt ein temperatursensitives Replicon. Das hat zur Folge, daß dieser Vektor nur bei einer Temperatur von 30°C als autonomes Plasmid vorliegt. Wird die Temperatur auf 39°C erhöht kann das Plasmid nicht mehr repliziert werden und geht somit bei den nächsten Zellteilungen verloren. Kloniert man nun interne Sequenzen eines bestimmten Gens in diesen Vektor, so besteht durch einfaches Crossover zusätzlich die Möglichkeit der Integration dieses Konstrukts in das Genom. Ein solches Ereignis führt zur Integration des gesamten Plasmids in das entsprechende Gen und somit zu dessen teilweiser oder vollständiger Inaktivierung. Der Grad der Inaktivierung hängt hierbei von der Lage des internen Genfragmentes im Bezug auf den 3'-Bereich des Gens ab. Gendisruptionen konnten nicht in *S. chrysomallus* durchgeführt werden, da dieser Organismus nur bei einer Temperatur von bis zu 30°C überleben kann. In Disruptions Experimenten kamen folgende in folgender Tabelle aufgeführten pGM160 Derivate zum Einsatz.

Name	Gen	Donororganismus	Fragmentgröße	Klonierungsstrategie
pAGMfk12	<i>fkfA</i>	<i>S. chrysomallus</i>	300 bp <i>SmaI</i>	pTZ18U
pGM177NS	<i>fkfA</i>	<i>S. coelicolor</i>	177 bp <i>NotI/SmaI</i>	pSL1180 pTZ18U
pAGMfk33	<i>fkfB</i>	<i>S. chrysomallus</i>	800 bp <i>StuI</i>	pTZ18U
pGM390SS	<i>fkfB</i>	<i>S. coelicolor</i>	390 bp <i>SalI</i>	pTZ18U
pGM340HE	<i>fkfB</i>	<i>S. coelicolor</i>	340 bp <i>HindIII/EcoRI</i>	PCR pTZ18U
pGMPSL160	Polylinker aus pSL1180	<i>E. coli</i>	160 bp <i>HindIII/EcoRI</i>	pSL1180

Tabelle 3: pGM160 Derivate zur Disruption von *fkf* Genen

Zur Konstruktion wurden, außer für pGM340HE, die natürlich vorliegenden Restriktionschnittstellen verwendet. Die internen Fragmente wurden entweder in pSL1180 zwischenkloniert oder direkt in pTZ18U ligiert, um die zur Klonierung in pGM160 notwendigen *HindIII/EcoRI* Schnittstellen anzufügen. Die *HindIII/EcoRI* Fragmente wurden

in pGM160 (*Hind*III/*Eco*RI) ligiert. Der Ligationsansatz wurde in *S. coelicolor* oder *S. lividans* transformiert.

Nach der Transformation und der Kontrolle der jeweiligen Disruptionskonstrukte wurde der plasmidtragende Stamm 3 Tage bei 30°C in 100 ml thiostreptonhaltigem YEME Medium angezogen. 1 ml dieser Kultur wurde in 100 ml thiostreptonfreies YEME Medium überführt und die Kultur für 2 bis 3 Tage bei 39°C inkubiert. Dann wurden verschiedenen Verdünnungstufen dieser Kultur auf R5 Platten mit Thiostrepton (50 µg/ml) ausplattiert und bei 39°C inkubiert. Die resistenten Kolonien wurden über mindestens 3 Zyklen auf R5/Tsr gestempelt oder ausgestrichen. Dann wurden Flüssigkulturen von Einzelkolonien angefertigt und der Analyse mittels Southern Blot, Western Blot oder PCR zugeführt.

3.8.2 Genreplacement

Das Genreplacement erfordert grundsätzlich ein doppel Crossover im downstream und upstream Bereich des zu untersuchenden Gens. Hierfür wurden Konstrukte gewählt, in denen zwischen ein möglichst großes Fragment aus dem 5'-Bereich des entsprechenden Gens und einem zweiten Fragment aus dem 3'-Bereich eine Resistenzkassette kloniert wurde. Als Resistenzmarker kamen dabei folgende Gene zum Einsatz *ermE* aus Plasmid pIJ4026 und *aph* aus Plasmid pIJ680 [Hopwood *et al.*, 1985]. Kommt es nach der Transformation mit linearisierter Plasmid DNA in den 5'- und 3'-Bereichen des betreffenden Gens zu jeweils einem Crossover, wird das Gen im Genom durch die Resistenzkassette ersetzt. Eine zweite Möglichkeit besteht im Einsatz von autonom replizierenden Plasmiden mit zwei verschiedenen Resistenzmarkern, welche aufgrund der hohen Homologien zum Genom instabil werden. Durch die Anzucht von Stämmen, die solche Plasmide tragen, kann es ohne Selektionsdruck zum Verlust oder dem Einbau dieser Plasmide kommen. Durch Ausplattieren auf Platten mit nur einem geeigneten Antibiotikum und nachfolgendem Screening auf Verlust der Doppelresistenz können Mutanten identifiziert werden. Die eingesetzten Konstrukte sind unter 4.1.2 näher beschrieben.

3.9 Heterologe Genexpression

3.9.1 Expression in *E.coli*

Für die heterologe Expression in *E. coli* wurde das "QIAexpress"-System der Firma Qiagen (Hilden) verwendet und nach den Protokollen des Herstellers verfahren. Die eingesetzten Expressionsvektoren pQE30 und pQE32 besitzen zwischen Startkodon und Polylinker eine Sequenz, die sechs mal in Folge für die Aminosäure Histidin kodiert. Dadurch wird unter

Kontrolle des T5-Promotors und zweier *lac*-Operator-Sequenzen (Induktion mit IPTG) das exprimierte Protein N-terminal mit einem sogenannten "hexa-His-Tag" fusioniert. Dies ermöglicht die Reinigung eines solchen Proteins an einer Nickelchelatomatrix [Hochuli *et al.*, 1987]. Die Expressionsvektoren pQE30 und pQE32 unterscheiden sich lediglich durch eine Verschiebung des Leserahmens durch Insertion eines Nukleotides im Polylinker.

Die Expression in pQE50 verläuft nach dem selben Prinzip, jedoch enthalten die so exprimierten Proteine keinen His-Tag. Zur Überprüfung der Expressionsplasmide wurden die Konstrukte zunächst in *E. coli* JM109 (*lacI^q*) transformiert. Zur Expression wurde *E. coli* M15 benutzt und bei 37°C oder 28°C kultiviert.

3.9.2 Expression in *Streptomyces*

Die heterologe Expression von Genen in Organismen der Gattung *Streptomyces* basierte auf dem Expressionsvektor pIJ702 unter der Kontrolle des *mel*-Promotors [Katz *et al.*, 1983]. Das Startcodon von *melC1* befindet sich im Bereich einer einmal im Plasmid vorkommenden *SphI*-Schnittstelle, so daß eine Klonierung in den Leserahmen des *melC1* Gens möglich ist. Zur Expression wurde der Shuttle Vektor pSPIJ002 verwendet, der als *E. coli* Anteil den Vektor pSP72 trägt. pIJ702 wurde *Bgl*III in pSP72 *Bgl*III cloniert, wobei die Eigenschaften von pIJ702 nicht verändert wurden. Das Plasmid wurde von F. Schauwecker konstruiert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

3.10 Untersuchung der DNA-Photoreparatur

Zur Untersuchung der DNA-Reparatur in Actinomyceten wurde die OD₆₀₀ von Flüssigkulturen aus der frühen Stationärphase bestimmt. Die Kulturen wurden so verdünnt, daß pro Platte etwa die gleiche Menge Zellen (ca. 3000) ausplattiert wurden. Unmittelbar nach dem Trocknen, wurden die Platten mit UV-Licht bestrahlt (11 cm, 10 W). Nach unterschiedlichen Bestrahlungszeiten wurden die Platten bei Tageslicht mit zusätzlicher Weißlichtbestrahlung (40 cm, 75W) und zur Kontrolle im Dunkeln bei 30°C inkubiert. Nach drei Tagen wurden die Kolonien ausgezählt.

3.11 Proteinanalytik

3.11.1 Zellaufschluß

Der Zellaufschluß erfolgte für analytische Ansätze mittels Ultraschall (B. Braun, USA, Labsonic U, Sonde: T40). Hierfür wurden 2 ml der entsprechenden Flüssigkultur 5 min bei 4°C und 10.000 rpm zentrifugiert. Der Kulturüberstand wurde dekantiert und die Zellen in 400 µl 50 mM TRIS pH 8,0 resuspendiert. *E. coli* wurde für 20 Sekunden bei 40 W sonifiziert, der Aufschluß von Streptomyceten erfolgte durch 3 x 20 Sekunden Beschallung bei 40 W.

Für Präparative Ansätze wurde *E. coli* aus 800 ml einer Hauptkultur durch Zentrifugation (20 min 4°C, 10.000 rpm) gewonnen und das Zellpellet im Puffer des ersten Chromatographieschrittes aufgenommen (3 ml Puffer pro Gramm Zellen). Streptomyceten wurden aus einem Gesamtvolumen von 1 Liter (10 x 100 ml in 300 ml Erlenmeyerkolben mit Stahlspiralen) durch Absaugen über einen Büchnertrichter mit Filterpapier gewonnen. Die Zellen wurden anschließend mit etwa 1 Liter Wasser gewaschen und ebenfalls im Puffer des ersten Chromatographieschrittes resuspendiert. In beiden Fällen wurde nach der Resuspension 5 mM MgCl₂ und DNase (50 µg/ml) zugegeben. Die Zugabe von DNase entfiel bei der Reinigung der Photolyase. Durch die zweifache Passage dieser Suspension durch eine „french press“-Zelle bei 15.000 psi wurden die Zellen aufgeschlossen. Nach 30 minütiger Inkubation bei 4°C wurden die unlöblichen Zellbestandteile abzentrifugiert (20 min, 4°C, 18.000 rpm). Der Überstand wurde dem ersten Reinigungsschritt für das jeweilige Enzym zugeführt.

3.11.2 Isolation von Membranen aus Streptomyceten

Zur Isolation von Membranen wurden zwei Tage alte Flüssigkulturen verwendet. Aus 4 g Zellen wurden die Membranen entsprechend Pahl and Keller [1994] isoliert und in Western Blots analysiert.

3.11.3 Proteinreinigung / Chromatographische Methoden

3.11.3.1 Metallaffinitätschromatographie

Heterolog exprimierte Proteine mit einem hexa-HIS-Tag wurde über Ni-NTA-Agarose gereinigt [Hochuli *et al.*, 1988]. Dazu wurde das QIAexpress-System (Qiagen) verwendet und nach den Angaben des Herstellers verfahren. Die Säule wurden mit 5 bis 10 ml Säulenmaterial gefüllt und mit dem 10 fachen Volumen Ni-NTA-Autragspuffer äquilibriert. Die Elution erfolgte durch einen Imidazolgradienten oder durch stufenweise Erhöhung der Imidazolkonzentration (bis 250 mM Imidazol in Ni-NTA Waschpuffer). Die Fraktionen mit Enzymaktivität wurden vereinigt und weiter aufgereinigt.

3.11.3.2 Anionenaustauschchromatographie

DEAE-Zellulose

Es wurde eine Säule mit 3 cm Durchmesser und 50 ml Säulenmaterial verwendet. Vor dem Auftragen des Rohextraktes wurde die DEAE-Zellulose mit mindestens dem 3-fachen Säulenvolumen des Auftragspuffers äquilibriert.

Die bei pH 8,0 an DEAE-Zellulose gebundenen Proteine wurden anschließend durch einen linearen NaCl-Gradienten (0 bis 1 M, 2 x 250 ml) eluiert. Fraktionen von 5 ml wurden gesammelt und anschließend auf ihre Enzymaktivität untersucht.

ResourceQ

Zur Reinigung bereits aufkonzentrierter Proteinproben wurden diese ggf. gegen einen geeigneten Puffer dialysiert und auf eine zuvor äquilibrierte 6 ml ResourceQ-Säule (Pharmacia) aufgetragen. Die gebundenen Proteine wurden in einem linearen NaCl-Gradienten eluiert. 1 ml Fraktionen wurden gesammelt und analysiert. Zur Chromatographie an ResourceQ wurde das FPLC-System der Firma Pharmacia verwendet.

3.11.3.3 Gelfiltration über Superdex™ 75

Nach der Äquilibration der Säule ü.N. mit dem entsprechenden Puffer bei 0,2 ml/min Flußrate an einer FPLC-Anlage (Pharmacia), wurden 1,5 ml angereinigte Enzymlösung auf die Superdex™ 75 Säule aufgetragen. Die Trennung der Proteine erfolgte mit einer Flußrate von 0,8 ml/min wobei Fraktionen von 1,6 ml gesammelt wurden.

3.11.3.4 Affinitätschromatographie

Als Reinigungsschritt für Proteine mit DNA-bindenden Eigenschaften diente die Auftragung von Proteinproben auf eine mit Photolyasepuffer äquilibrierte Affinitätssäule (Blue-Sepharose, Pharmacia, 1 x 10 cm). Gebundene Proteine wurden in einem linearen Gradienten von 0 bis 1 M KCl (2 x 200 ml) eluiert, Fraktionen zu je 5 ml, die das gewünschte Protein enthielten, wurden anschließend vereinigt und über Nacht oder 2 x 2 Stunden gegen 2 x 3 l Photolyasepuffer mit 100 mM KCl dialysiert.

3.11.4 Proteinbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach Bradford [1976]. 10 µl einer Proteinlösung wurden auf eine Mikrotiterplatte pipettiert und mit 100 µl Bradford-Reagenz versetzt. Die Proben wurden dann in einem ELISA-Reader (Dynatek, Denkendorf) bei 580 nm vermessen. Als Standard dienten verschiedene Konzentrationen einer BSA-Lösung.

Bei gereinigten Proteinen wurden Spektren von 250 nm bis 350 nm aufgenommen. Aus der Differenz der Absorption bei 280 nm und 310 nm und dem Extinktionskoeffizienten [Gill and

van Hippel, 1989] konnte die Proteinkonzentration entsprechend dem Lambert-Beer'schen Gesetz bestimmt werden.

3.11.5 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Zur Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe wurde eine SDS-PAGE durchgeführt [Laemmli, 1970]. Die Gelelektrophorese wurde mit 10%igen oder 15%igen Polyacrylamidgelen durchgeführt. Die Proteinproben wurden mit PAGE-Probenpuffer im Verhältnis 4:1 gemischt und für 5 min auf 95°C erhitzt. Als Molekulargewichtsmarker diente der SDS-7 Marker der Firma Sigma mit Markerproteinen der folgenden Größen: 14, 20, 24, 29, 36, 45, 66 kDa. Das Anfärben der Gele erfolgte mit Coomassie Brilliant Blue.

3.11.6 Western-Blot-Analyse

Nach Auftrennung der Proteine durch SDS-PAGE wurden die Proteine nach dem "semidry"-Verfahren unter Benutzung einer Biometra-Apparatur auf eine Nitrocellulose-Membran (Hybond C) transferiert. Die Arbeiten der Western-Blot-Analyse wurden nach einem Standardprotokoll der Firma Schleicher & Schuell durchgeführt [Schleicher & Schuell, 1995]. Die gewählten Transferbedingungen waren 5 mA/cm² für 30 min. Als primäre Antikörper dienten anti-FKBP12-Antikörper oder anti-FKBP33-Antikörper, die im Auftrag von U. Keller bei der Firma Eurogentec (Belgien) durch Immunisierung eines Kaninchens mit gereinigtem FKBP12 bzw. FKBP33 aus *S. chrysomallus* erzeugt wurden [Pahl and Keller, 1994]. Dieser Antikörper wurde in einer 1:2000 Verdünnung in TBS eingesetzt. Zur Detektion wurde ein Anti-Rabbit-IgG-Alkalische Phosphatase-Konjugat (Sigma) entsprechend der Herstellerangabe verwendet. Zum Nachweis von Hexa-His-Fusionsproteinen wurde nach dem Transfer auf HybondC ein monoklonaler anti-Penta-HIS-Antikörper (Qiagen) in einer 1:6000 Verdünnung und als sekundärer Antikörper der Anti-Mouse-IgG-Alkalische Phosphatase-Konjugat (Sigma) eingesetzt. Immunreaktive Proteine wurden durch Inkubation mit 0,25 mg/ml NBT und 0,15 mg/ml BCIP in Substratpuffer detektiert.

3.11.6.1 N-terminale Sequenzierung

Es wurden ca. 50 pmol Protein auf ein 15%iges Acrylamidgel aufgetragen. Nach der Gelelektrophorese wurde das Protein auf eine PVDF-Membran nach dem "semidry"-Verfahren geblottet (20 min, 5 mA/cm²). Die PVDF-Membran wurde zuvor mit Methanol (5 s), Wasser (5 min) und Semi-Dry-Blotting-Puffer (15 min) behandelt. Nach dem Blotten wurde die Membran 3 x 15 min mit Wasser gewaschen und anschließend mit PonceauS-Lsg. gefärbt. Die angefärbte Proteinbande wurde ausgeschnitten und 2 x mit Wasser gewaschen.

Die N-terminale Sequenzierung des geblotteten Proteins erfolgte an einem Protein-Mikrosequencer der Firma Applied BioSystems (freundlicherweise durchgeführt von Dr. Schröder, FU-Berlin).

3.11.7 Messung der PPIase-Aktivität

Basierend auf der isomerspezifischen Proteolyse wurde die PPIase-Aktivität nach einer von Fischer *et al.* [1983] entwickelten Methode bestimmt.

Die eingesetzten Hilfsproteasen spalten das Chromophor 4-Nitroanilid nur dann vom Substrat Suc-Ala-Xaa-Pro-Phe-pNA ab, wenn die Xaa-Pro Bindung in der *trans*-Konformation vorliegt. Der Überschuß an Protease führt in der ersten Phase der Reaktion zum schnellen Abbau des in *trans*-Konformation vorliegenden Anteils des eingesetzten Substrates (85 - 90%). Dies zeigt sich in einem Sprung der Absorption bei 390 nm. Nach ca. 15 s läßt sich die langsame Umwandlung der *cis*- in *trans*-Konformere beobachten. Die Umwandlung ist bei genügend hoher Proteasekonzentration von dieser unabhängig.

Die Messungen erfolgten stets bei 10°C, da bei dieser Temperatur die unkatalysierte Isomerisierung hinreichend langsam abläuft, um die Enzymkatalyse photometerisch verfolgen zu können.

400 µl Meßpuffer wurden in der Küvette 3 Minuten bei 10°C temperiert. 30 Sekunden vor dem Start der Messung erfolgte die Zugabe von 5 µl Substrat. Nach weiteren 10 Sekunden wurden die Proteinproben zugegeben. Der Start der Reaktion erfolgte durch Zugabe von 100 µl α-Chymotrypsin-Lösung.

240 s wurde die Reaktion bei 390 nm am Spektrometer verfolgt. Die Auswertung der Meßdaten erfolgte nach einem Geschwindigkeitsgesetz erster Ordnung.

Die so erhaltene Geschwindigkeitskonstante k_{obs} setzt sich wie folgt zusammen:

$$k_{obs} = k_{un} + k_{enz}$$

Der z.T. zur Auswertung verwendete Beschleunigungsfaktor BE errechnet sich folgendermaßen:

$$BE = \frac{k_{obs}}{k_{un}} - 1$$

Der Wert k_{un} wurde durch Messungen ohne PPIase bestimmt.

Unter der Voraussetzung $[S]_0 \ll K_M$ gilt bei der Messung mit der PPIase-Konzentration $[E]_0$:

$$\frac{k_{cat}}{K_M} = \frac{k_{obs} - k_{un}}{[E]_0}$$

Der Quotient k_{cat}/K_M ist der Anstieg von $k_{enz} = f([E]_0)$ und dient als Maß für die spezifische Aktivität der eingesetzten PPIase.

3.11.8 Mesung der Photolyaseaktivität

Zum *in vitro* Nachweis einer lichtabhängigen DNA-Photolyase wird der hypochrome Effekt von oligo(dT) nach UV-Bestrahlung ausgenutzt. Bei der Ausbildung der Thymindimere nimmt die Absorption bei 264 nm ab. Kommt es nachfolgend zur enzymatischen Spaltung dieser Dimere so ist photometrisch ein Anstieg der Absorption zu verfolgen [Kato *et al.*, 1997].

Zunächst wurden hierfür 2 ml einer 280 µM poly(dT) Lösung in Photolyasepuffer ohne EDTA in einer 3 ml Quarzküvette mit UV-Licht bestrahlt (4 cm, 10 W). Die Ausbildung der Thymindimere wurde photometrisch verfolgt. Nach 5 min war keine weitere Änderung der Absorption mehr zu verzeichnen. Die dimerisierte poly(dT) Lösung wurde im Dunkeln auf Eis gelagert.

300 µl der UV-geschädigten poly(dT)-Lösung wurden in eine neue Quarzküvette überführt und auf 30°C erwärmt. Nach der Zugabe der entsprechenden Enzympräparationen wurde die Küvette zunächst im Dunkeln inkubiert. Zu verschiedenen Zeiten wurde die OD₂₆₄ bestimmt. Der gleiche Ansatz wurde danach im Licht inkubiert. Erneut wurde nun der Verlauf der Reaktion bei 264 nm gemessen.

4 Ergebnisse

4.1 Gerichtete Mutationen im *fkf* Gencluster von Streptomyceten

4.1.1 Disruption von *fkf* Genen in Streptomyceten

Zur Untersuchung der Funktion der in der Arbeitsgruppe Keller isolierten und klonierten *fkf* Gene aus *S. chrysomallus*, sollten Insertionsmutationen in diesen Genen erzeugt werden, um aus den resultierenden Phänotypen Rückschlüsse auf mögliche Funktionen dieser Proteine ziehen zu können. Die zugrundeliegenden Genotypen sollten nachfolgend durch Komplementation in *trans* in den ursprünglichen Wildtyp revertiert werden.

Für diesen Ansatz wurde das von Muth *et al.* [1989] etablierte Verfahren zur Gendisruption in Streptomyceten eingesetzt. Diese Methode des „mutational cloning“ beruht auf der Verwendung autonomer Plasmide (in diesem Fall pGM160), die ein temperatursensitives Replicon aufweisen. In solch einen Vektor wird ein internes Fragment des zu untersuchenden Gens kloniert und das Konstrukt in Streptomyceten transformiert. Der plasmidtragende Stamm wird zuerst bei permissiver Temperatur (30°C) in Anwesenheit eines Antibiotikums, in diesem Fall Thiostrepton, angezüchtet. Im zweiten Zyklus wird die Temperatur auf die nicht-permissive Temperatur (39°C) erhöht und in Tsr-freiem Medium gearbeitet. In diesem Stadium verlieren innerhalb von 72 h etwa 99,9 % aller Zellen das Plasmid. Ein geringer Teil der Zellen integriert jedoch den gesamten Vektor, als Ergebnis eines Einfach-Crossovers, in die entsprechende genomische Sequenz des zuvor klonierten Fragments. Das führt zur Disruption des betreffenden Gens und zur Ausprägung einer chromosomal kodierten Antibiotikaresistenz. Auf diese Resistenz wird nun bei 39°C auf thiostreptonhaltigen Agarplatten selektioniert.

Zu Beginn der Arbeit lagen nur Sequenzinformationen über die *fkf* Gene aus *S. chrysomallus* vor [Pahl *et al.*, 1994]. Da dieser Organismus jedoch nur bis zu einer Temperatur von 30°C wachsen kann, schied er für den Einsatz von pGM160 Derivaten zur Gendisruption aus. Unter der Annahme einer engen Verwandtschaft von *S. chrysomallus* zu *S. lividans* und *S. coelicolor* wurden jedoch pGM160 Konstrukte mit Bereichen aus dem 5'-Bereich des *fkfA* Gens (Acc. Nr.: M98428; 300 bp *Sma*I Fragment; nt 156-456 [Pahl *et al.*, 1994]), sowie des *fkfB* Gens (Acc.Nr.: Z34523; 341 bp *Stu*I/*Sst*I Fragment, nt 334-675 [ebd.]) von *S. chrysomallus* zur Disruption der analogen Gene in *S. lividans* und *S. coelicolor* eingesetzt.

Nach dem unter 3.8.1 beschriebenen Verfahren gelang es jedoch nicht, Disruptanten der *fkf* Gene von *S. lividans* und *S. coelicolor* zu erhalten. Die wenigen erhaltenen thiostreptonresistenten Isolate, die in Southern- und Westernblotanalysen untersucht wurden, wiesen entweder keine Veränderungen im Genom oder sie wiesen ektopische Integrationen auf. Die Gründe hierfür

könnten mögliche essentielle Funktionen der betreffenden Gene oder die letztendlich doch zu geringe Homologie der eingesetzten Genfragmente sein.

Aus diesem Grund wurden die Gene *fkba* und *fkbb* aus *S. chrysomallus* zur Hybridisierung einer *S. coelicolor* Genbank an das John Innes Centre nach Norwich gesandt, um die betreffenden *S. coelicolor* Gene durch Hybridisierung einer Cosmidgenbank isolieren zu lassen. Beide *fkba* Gene aus hybridisierten auf dem Cosmid I41 aus der von Redenbach *et al.* [1996] konstruierten Cosmidgenbank. Die Sequenz dieses Cosmids wurde nachfolgend im Rahmen des Genomprojekts von *S. coelicolor* zugänglich. Somit hatten wir 41 kb des *S. coelicolor* Genoms zur Verfügung um die Disruptionsexperimente an den homologen Genen *fkba* und *fkbb* aus *S. coelicolor* durchzuführen. *S. coelicolor* ist der genetisch am besten untersuchte Vertreter der Gattung *Streptomyces*. Aufgrund der hohen Rekombinationsfrequenz sollte dieser Organismus für Disruptionsexperimente besser geeignet sein als *S. chrysomallus*.

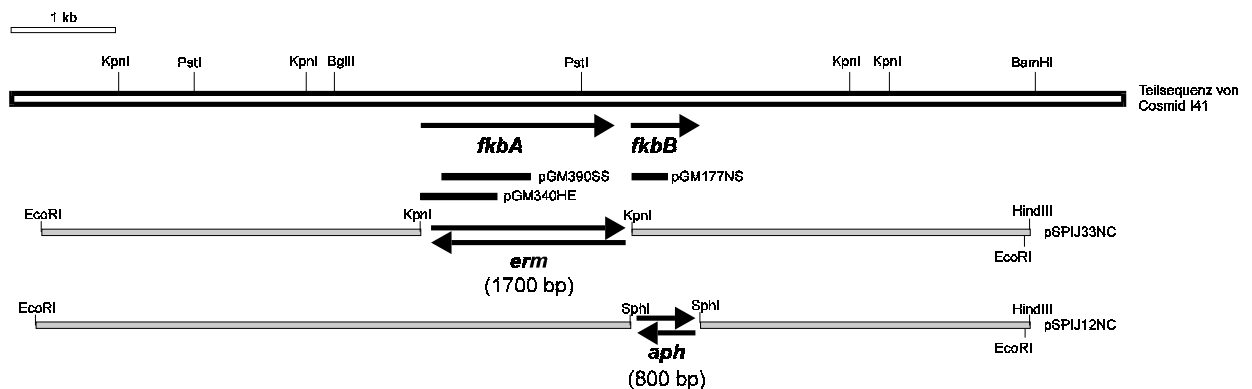


Abb. 4 Restriktionskarte eines 5,4 kb Ausschnitts von *S. coelicolor* Cosmid I41

Markiert sind wesentliche Restriktionsschnittstellen. Die Gene *fkba*, *fkbb* und die verwendeten Reistenzkassetten sind durch Pfeile symbolisiert. Die zur Gendisruption eingesetzten Fragmente sind als schwarze Balken und die zum Replacement eingesetzten Fragmente durch graue Balken dargestellt.

4.1.1.1 Disruption von *fkba*

Zur Disruption von *fkba* in *S. lividans* und *S. coelicolor* wurde ein natürliches 177 bp großes *NotI/SmaI* Fragment zunächst in pSL1180 und nachfolgend als *HindIII/EcoRI* Fragment in pGM160 (*HindIII/EcoRI*) kloniert. Das resultierende Konstrukt pGM177NS wurde direkt in *S. lividans* und nachfolgend in *S. coelicolor* transformiert.

Um ektopische Integrationen über den Vektorrumpf ausschließen zu können wurde als Kontrollvektor pGMPSL160 konstruiert, der nur *HindIII/EcoRI* geschnittenen nichtcodierenden Polylinker aus pSL1180 in *HindIII/EcoRI* geschnittenem pGM160 enthält.

Bei Disruptionsversuchen analog 3.8.1 ergab sich eine Verteilung von Transformanten, entsprechend Tabelle 4.

Stamm Plasmid	30°C Tsr	39°C Tsr 1. Passage	39°C Tsr 2. Passage	39°C Tsr 3. Passage	39°C Tsr 4. Passage	39°C Tsr Flüssigkultur
<i>S. lividans</i> pGMPSL160	Rasen	ca. 1000	30	4	0	0
<i>S. lividans</i> pGM177NS	Rasen	Rasen	230	15	5	2
<i>S. coelicolor</i> pGMPSL160	Rasen	ca. 1000	50	10	2	0
<i>S. coelicolor</i> pGM177NS	Rasen	Rasen	300	26	10	7

Tabelle 4: Experiment zur Disruption von *fkbA* in *S. coelicolor* und *S. lividans*

Dargestellt ist das Ergebnis eines repräsentativen Experiments. Aufgelistet ist jeweils die Anzahl der erhaltenen thioestreptonresistenten Kolonien.

Wie aus Tabelle 4 hervorgeht wurden nach einem vollständig durchlaufenen Disruptionsexperiment mit einer Häufigkeit von ca. 1:1000000 thioestreptonresistente Klone erhalten. Diese Klone wurden in Flüssigkultur angezogen und in Hinblick auf deren Phäno- und Genotyp analysiert.

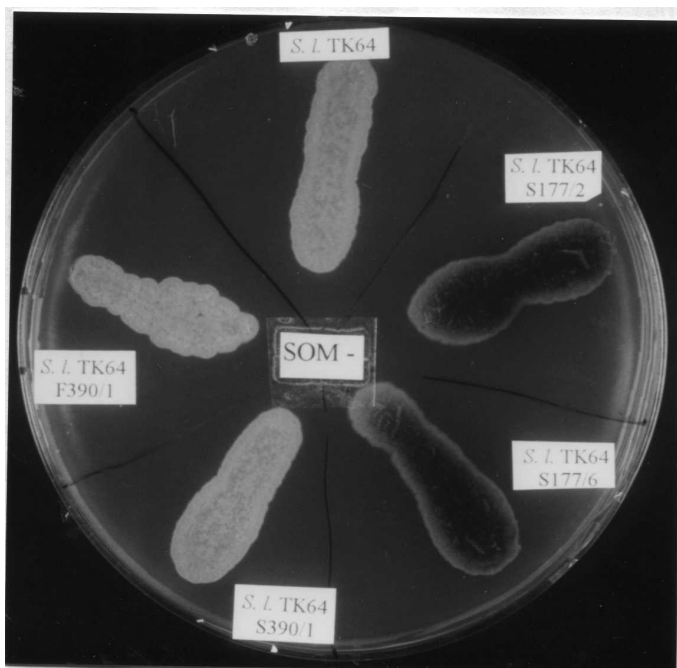


Abb. 5 Phänotyp von *S. lividans*

Mutanten auf SOM-Medium

Abgebildet sind der Wildtypstamm *S. lividans*, sowie die Mutanten S177/2 und S177/6 die Mutationen im *fkbA* Gen tragen sollten, sowie zwei Mutanten (F390/2 und S390/2) aus Disruptionsversuchen für *fkbB* (siehe 4.1.1.2). Die Zellen wurden 3 Tage auf thioestrepton- und glukosefreiem Minimalmedium mit 1% Sojamehl bei 37°C angezogen. Der auffällige Phänotyp ist auf glukosehaltigen Medien nicht zu beobachten (nicht gezeigt).

Auf der Suche nach einer phänotypischen Veränderung, die eventuell mit einer Mutation in *fkbA* verbunden ist, wurden die erhaltenen Mutanten auf verschiedenen Festmedien angezogen. Die *S. coelicolor* Mutanten zeigten keine Veränderungen gegenüber dem Wildtyp. Die beiden

Mutanten von *S. lividans* zeigten jedoch bei einem Mangel an Glucose im Medium deutliche phänotypische Veränderungen im Vergleich zum Wildtyp (siehe Abb. 5).

Beide Mutanten bildeten ein graubraunes Sporenpigment, welches sich aber nicht aus den Sporen extrahieren ließ. Die Natur dieses Pigmentes bleibt somit ungeklärt.

Zur Analyse des Genotyps der erhaltenen Mutanten wurde nachfolgend die chromosomale DNA isoliert. Durch den Einbau des gesamten Konstrukts in das Chromosom kommt es zum Einfügen zusätzlicher Restriktionschnittstellen. Diesen Umstand kann man für den Nachweis der Vektorintegration mittels Southern Blot ausnutzen. Behandelt man die DNA des Wildtyps und der Integrationsmutanten z.B. mit *KpnI*, so sollte im Wildtyp von *S. coelicolor* ein etwa 2800 bp Fragment mit der *fkfA* Sonde hybridisieren. Bei korrekter Integration von pGM177NS in das Wirtsgenom sind zwei hybridisierende Fragmente von 1,8 kb und 3,6 kb mit dieser Sonde zu erwarten. Verwendet man hingegen die Resistenzkassette (*tsr*) als Sonde im Southern Blot, sollte im Wildtyp kein Signal nachweisbar sein. In den Mutanten müßte jedoch ein Fragment von 3,6 kb mit dieser Sonde hybridisieren. Da der entsprechende Genlocus in *S. lividans* noch nicht sequenziert wurde, ist keine Prognose der Ergebnisse der Southernhybridisierung möglich.

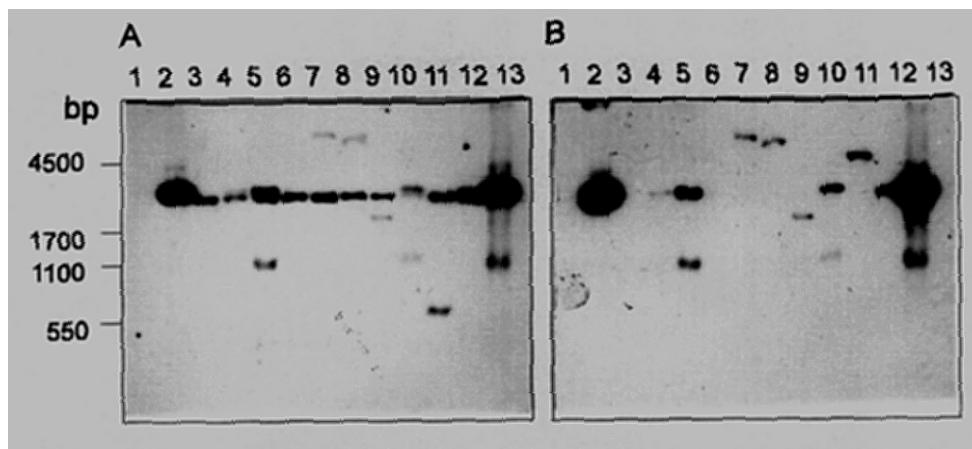


Abb. 6 Southern Blot von *Streptomyces* Mutanten nach der Gendisruption mit pGM177NS

Es wurden jeweils identische DNA-Mengen eines *KpnI*-Verdau auf einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt und mit radioaktiven Sonden (A: *fkfA* Gen als Sonde und B: *tsr* Gen als Sonde) bei 65°C hybridisiert.

- | | |
|-----------------------------|------------------------------------|
| 1 λ <i>PstI</i> | 5 <i>S. lividans</i> S177/6 |
| 2 pGM177NS | 6 <i>S. coelicolor</i> |
| 3 <i>S. lividans</i> | 7-13 <i>S. coelicolor</i> S177/1-7 |
| 4 <i>S. lividans</i> S177/2 | |

Wie in Abb. 6 (A) zuerkennen ist, kommt es bei allen Transformanten zum Auftreten eines zusätzlichen hybridisierenden Fragments. Die Größen dieser Fragmente differieren jedoch stark und decken sich nicht mit den erwarteten Fragmentgrößen. Zusätzlich sind die

Intensitätsunterschiede der Signale, die mit der *fkbA* Sonde hybridisieren, nicht mit dem Auftreten definierter Integrationen zu erklären. Abb. 6 (B) zeigt insofern ein erwartetes Bild, als nur ein Fragment mit der *tsr* Sonde hybridisiert.

Bei den Transformanten handelt es sich damit um echte Integranten. Diese enthalten aber mit hoher Wahrscheinlichkeit noch das intakte *fkbA* Gen. Somit erklären sich auch die Intensitätsunterschiede bei der Hybridisierung mit *fkbA*. *S. lividans* S177/6 zeigt noch einen anderen möglichen Fall. Dieser Stamm könnte den Vektor mehrfach integriert haben, dies würde die Anzahl der Hybridisierungssignale, als auch deren Intensitäten erklären. Diese Ergebnisse zeigten jedoch erneut auch das Vorliegen möglicher ektopischer Integrationen an.

Aus diesem Grund wurde an der chromosomalen DNA eine PCR zur Amplifikation des *fkbA* Gens, mit möglicherweise integriertem Vektor, durchgeführt. Die verwendeten Primer FK12f 5'-GGAGCTGAACGCATGCGCATCGACAAG-3' und Fk12r 5'-CCGAACGCCGA GAGCTCGTACTTCGAT-3' überspannen das Start- bzw. Stopcodon von *fkbA*. Die PCR Bedingungen waren folgende: Denaturierung 1 min 95°C, Annealing 1,5 min 60°C, Polymerisation 2 min 72°C, 30 Zyklen. Zusätzlich wurden nur je 25 pmol der Primer eingesetzt.

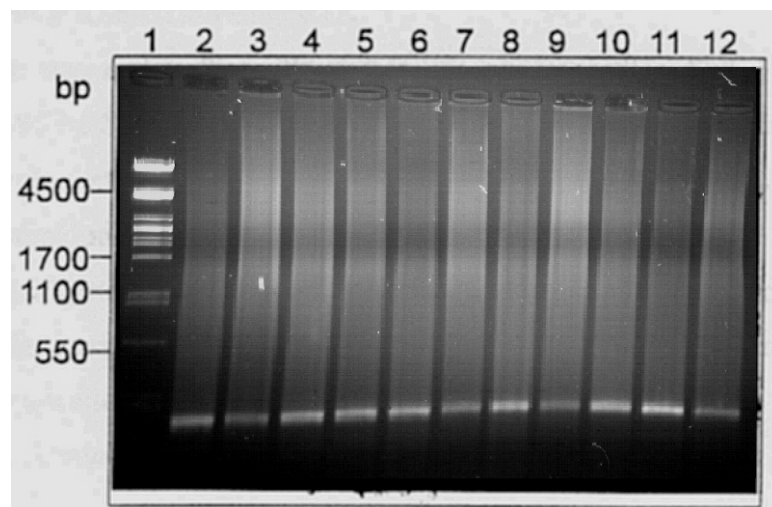


Abb. 7 PCR zur Amplifikation von *fkbA* aus *Streptomyces* nach der Gendisruption mit pGM177NS

Je 10 µl PCR-Ansatz wurden auf einem 2%igen Agarosegel getrennt.

- | | |
|-----------------------------|------------------------------------|
| 1 λ PstI | 4 <i>S. lividans</i> S177/6 |
| 2 <i>S. lividans</i> | 5 <i>S. coelicolor</i> |
| 3 <i>S. lividans</i> S177/2 | 6-12 <i>S. coelicolor</i> S177/1-7 |

In keiner der untersuchten Mutanten ist eine Veränderung gegenüber dem Wildtyp festzustellen. In jedem Fall wird ein ca. 450 bp Fragment amplifiziert. Die erwartete Größe des Fragments beträgt 460 bp. Das stützt die Annahme, daß es sich bei den untersuchten Mutationen höchstwahrscheinlich um ektopische Integrationen handelt. Da im

Kontrollexperiment mit pGMPSL160 keine Integranten nachgewiesen werden konnten, läßt sich eine ektopische Integration über den Vektorrumpf ausschließen. Möglicherweise ist FKBP12 essentiell für *Streptomyces* und eine Mutation in diesem Gen ist mit dem gewählten System nicht möglich, da keine Möglichkeit besteht, Letalmutationen direkt nachzuweisen. Weiterhin muß festgestellt werden, daß der beobachtete Phänotyp der *S. lividans* Mutanten, die Ausbildung eines graubraunen Sporenpigments, nicht auf einen Defekt des *fkfA* Gens zurückzuführen ist.

Interessanterweise ist zwischen den Wildtypstämmen *S. lividans* und *S. coelicolor* weder im Southern Blot noch in der PCR ein Unterschied zu erkennen, was auf eine sehr hohe Homologie im *fkf* Locus der beiden Organismen hinweist.

4.1.1.2 Disruption von *fkfB*

Wie unter 1.2.3 dargelegt, wurde für FKBP33 eine dem SurA und/oder PpiD aus *E. coli* vergleichbare Funktion vermutet. Es war bekannt, daß eine funktionale Domäne aus PpiD die Funktion von SurA übernehmen kann und erst die Deletion beider Gene (2 aktive PPIase Domänen) letal ist [Dartigalongue and Raina, 1998]. Daher wurden zur Disruption von *fkfB* zwei unterschiedliche Konstrukte eingesetzt.

Zur Konstruktion des ersten Plasmids wurde ein chromosomales *SalI* Fragment von *fkfB* verwendet. Das 390 bp *SalI* Fragment wurde nach verschiedenen Subklonierungen zunächst in pTZ18U (*SalI*) kloniert und sequenziert. Danach wurde es *HindIII/EcoRI* in pGM160 (*HindIII/EcoRI*) umklont. Das so entstandene Konstrukt pGM390SS wurde direkt in *S. lividans* und nachfolgend in *S. coelicolor* transformiert. Bei der Integration von pGM390SS sollte der für die gesamte N-terminale Domäne und den Membrananker von FKBP33 kodierende Bereich weiter exprimiert werden.

Zur Klonierung des zweiten Disruptionskonstruktes wurde eine PCR mit folgenden Primern durchgeführt:

FKO33f: 5'-GAGGCCCCCAGCATGCGCCGACGCTCA-3'

FKO33r: 5'-AGAAGACCTTCGAGCTCTGCCAGACCT-3'

Das amplifizierte 340 bp Fragment wird von einer *SphI* Schnittstelle auf dem Startcodon von *fkfB* und von einer *SstI* Schnittstelle flankiert. Dieses Fragment reicht vom Startcodon bis ca. in die Hälfte des kodierenden Bereichs für die erste FKBP-Domäne und würde bei der Expression zu einem inaktiven Derivat führen.

Es wurde zunächst *SphI/SstI* in pTZ18U kloniert. Durch *HindIII/EcoRI* Behandlung und Ligation in pGM160 mit anschließender Transformation in Streptomyceten wurde pGM340HE generiert.

Die Integration von pGM340HE in *fkfB* sollte zur vollständigen Inaktivierung auch der ersten Domäne von FKBP33 führen.

Bei Disruptionsversuchen mit pGM390SS war es möglich sowohl mit *S. lividans*, als auch mit *S. coelicolor* eine Reihe von resistenten Klonen zu erhalten. Die Häufigkeit der Rekombinationsereignisse war etwa um den Faktor 100 höher als im Falle von pGM177NS.

Alle getesteten Klone zeigten jedoch keine phänotypischen Auffälligkeiten. Zum Nachweis einer Integration des Plasmids pGM390SS in *fkfB* wurden erneut Southern Blots mit *fkfB* und *tsr* als Sonde durchgeführt (siehe Abb. 8).

Im Falle einer korrekten Integration waren für *S. coelicolor* Mutanten, nach *KpnI* Behandlung der chromosomalen DNA, erneut zwei Fragmente von 1,4 kb und 2,0 kb zu erwarten, die mit *fkfB* als Sonde hybridisieren, wohingegen im Wildtyp ein 2,8 kb Fragment hybridisieren sollte. Ein 2,6 kb Fragment enthält die Thiostreptonresistenzkassette und sollte mit *tsr* als Sonde hybridisieren.

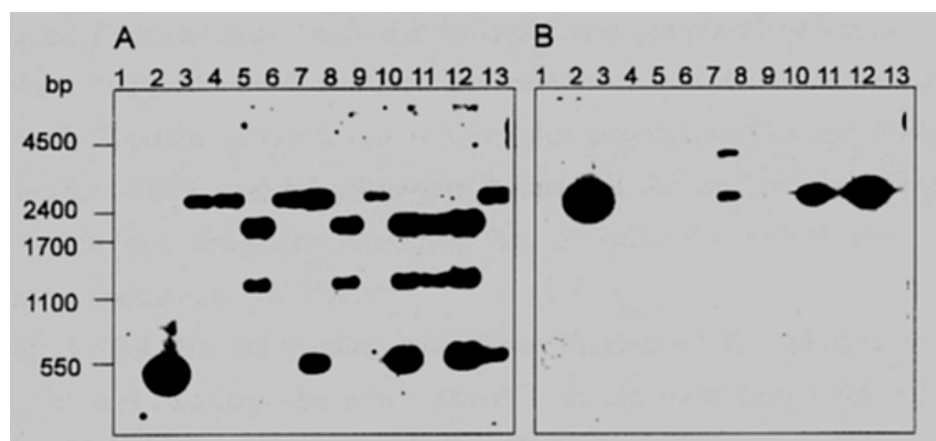


Abb. 8 Southern Blot von *Streptomyces* Mutanten nach der Gendisruption mit pGM390SS

Es wurden jeweils identische DNA-Mengen eines *KpnI*-Verdau auf einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt und mit radioaktiven Sonden (A: *fkfA* Gen als Sonde und B: *tsr* Gen als Sonde) bei 65°C hybridisiert.

- | | | |
|---|---------------------------|------------------------------------|
| 1 | λ <i>PstI</i> | |
| 2 | pGM390S | 5 <i>S. lividans</i> S390/2 |
| 3 | <i>S. lividans</i> | 6 <i>S. coelicolor</i> |
| 4 | <i>S. lividans</i> F390/2 | 7-13 <i>S. coelicolor</i> S390/1-7 |

Abb. 8 (A) zeigt, daß bei *S. lividans* S390/2 ein zusätzliches Hybridisierungssignal zu beobachten ist. Gleichzeitig zeigt sich ein deutlicher Größenunterschied der hybridisierenden Banden im Vergleich zum Wildtyp. Die Größen der hybridisierenden Banden decken sich auch in diesem Fall mit den für *S. coelicolor* erwarteten Größen. Ein entsprechendes Hybridisierungssignal ist auch mit *tsr* als Sonde in Abb. 8 (B) zu erkennen. Dies zeigt, daß das *fkfB* Gen in *S. lividans* S390/2 disruptiert ist.

Bei *S. lividans* F390/2 ist kein Unterschied zum Wildtyp zu erkennen. Es tritt auch kein zusätzliches Signal in Abb. 8 (A) auf, wie es im Falle ektopischer Integration zu erwarten wäre. Wahrscheinlich handelt es sich bei diesem Klon nicht um eine Insertionsmutante.

Im Falle von *S. coelicolor* zeigen beide Southern Blots ein sehr interessantes Bild vom Genotyp der verschiedenen hier untersuchten Mutanten. *S. coelicolor* S390/2 und 5 verhalten sich in beiden Southern Blots wie es für eine korrekte Integration von pGM390SS ins *fkB* Gen erwartet wurde. Mit zwei 1,5 kb und 2,0 kb großen Banden, die mit *fkB* hybridisieren und einer 2,6 kb Bande die mit *tsr* hybridisiert

S. coelicolor S390/4 und 6 zeigen hingegen Mehrfachintegration (ca. 40 Kopien) oder autonome Vektoren nach erfolgter korrekter Integration im *fkB*. Es sind die selben Fragmente entstanden, die auch bei Einfachintegrationen nachzuweisen sind. Die Mehrfachintegration zeigt sich in sehr starken Hybridisierungssignalen in Abb. 8 (B) und durch ein zusätzliches hybridisierendes Fragment in der Größe des *SalI*-Fragments von pGM390SS in Abb. 8 (A).

S. coelicolor S390/1 /3 und 7 enthalten das natürliche *fkB* Gen und ein zusätzliches hybridisierendes Signal in der Größe des zur Disruption eingesetzten Plasmids. Zusätzlich sind bei *S. coelicolor* S390/1 zwei hybridisierende Banden mit der *tsr*-Sonde zu erkennen. Dies weist erneut auf eine ektopische Integration hin. *S. coelicolor* F390/3 und 7 enthalten möglicherweise noch autonomen Vektor.

S. coelicolor S390/2 /4/5 und 6 sollten nach diesen Ergebnissen Disruptionen im *fkB* Gen aufweisen. Um dies zu überprüfen wurde eine PCR an chromosomaler DNA der Mutanten durchgeführt. Hierbei kamen folgende Primer zum Einsatz.

fk33f: 5'-GAGGCCCCCAGCATGCGCCGACGCTCA-3'

fk33r: 5'-TGCTCACGTGTTGAGCTCCTGCTTGTTTC-3'

Die Primer überlappen das Start- bzw. das Stopcodon von *fkB*.

Bei Bedingungen analog 4.1.1.1 wurde die PCR durchgeführt.

Die für den Wildtyp erwartete Fragmentgröße beträgt hierbei 1087 bp. Bei vollständiger Integration von pGM390SS sollte das amplifizierte Fragment zusätzlich den Vektoranteil tragen, somit ergäbe sich eine Größe von 4,6 kb. Bei der Mehrfachintegrationen kämen jeweils Vielfache von 3533 bp hinzu.

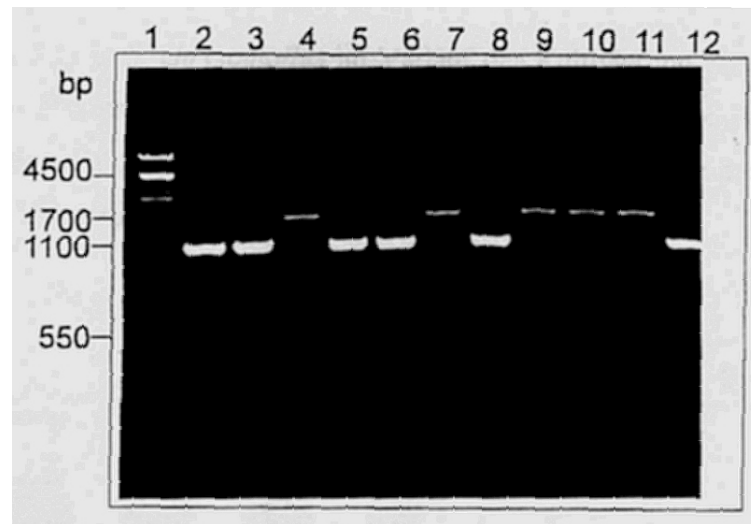


Abb. 9 PCR an chromosomaler DNA vom Southern Blot von *Streptomyces* Mutanten nach der Gendisruption mit pGM390SS

Aufgetragen sind je 10 µl PCR-Ansatz, der auf einem 2%igen Agarosegel getrennt wurde.

- | | | |
|---|---------------------------|------------------------------------|
| 1 | λ <i>Pst</i> I | |
| 2 | pGM390S | 5 <i>S. lividans</i> S390/2 |
| 3 | <i>S. lividans</i> | 6 <i>S. coelicolor</i> |
| 4 | <i>S. lividans</i> F390/2 | 7-13 <i>S. coelicolor</i> S390/1-7 |

Wie in der obigen Abbildung zu erkennen ist, bestätigen die PCR-Experimente, an chromosomaler DNA der Mutanten, die Ergebnisse der Southern Blotanalyse für *S. lividans* F390/2, *S. coelicolor* S390/1 /3 und /7 die keine Veränderung des *fkfB* Gene erkennen lassen. Dagegen ist bei den Mutanten *S. lividans* S390/2, *S. coelicolor* S390/2 und /5 die ursprüngliche 1087 bp Bande nicht mehr zu erkennen. Es tritt jedoch eine unspezifische Nebenreaktion resultierend in einer ca. 1700 bp Band auf. Zusätzlich tritt aber auch schwach das erwartete amplifizierte 4,6 kb Fragment auf. Letzteres ist bei den Mehrfachintegranten *S. coelicolor* S390/4 und /6 erwartungsgemäß nicht mehr zu erkennen. Die Daten aus der PCR decken sich somit vollständig mit denen der Southern Hybridisierungen.

Da die Mutanten aber wie oben erwähnt keinen detektierbaren Phänotyp aufwiesen, war anzunehmen, daß die Integration entweder ein um eine Domäne verkürztes FKBP33 verursacht hatte, oder daß FKBP33 nicht essentiell im Lebenszyklus von *S. coelicolor* ist. Im ersten Fall sollte es möglich sein, in den Membranen der Mutanten das um eine Domäne verkürzte FKBP33 als ca. 20 kDa Bande in Immunoblotanalysen mit Antikörpern gegen das FKBP33 aus *S. chrysomallus* nachzuweisen. Für diese Untersuchung wurden nur *S. lividans* S390/2 und *S. coelicolor* S390/2 sowie die entsprechenden Wildtypen verwendet (Abb. 10).

Wie in Abb. 10 zu erkennen ist, fehlt beiden Mutanten das FKBP33. Hingegen weisen die Mutanten die erwartete immunreaktive Bande der Größe 20 kDa auf, die in den entsprechenden Wildtypen entweder nicht oder nur sehr schwach nachzuweisen ist. Es ist

bekannt, daß FKBP33 in *S. chrysomallus* im Verlauf der Kultivierung proteolytisch abgebaut wird. Nach dieser Prozessierung entsteht ebenfalls eine immunreaktive Bande von 20 kDa. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, daß die C-terminale Domäne, oder das gesamte FKBP33 nur in den frühen Wachstumsphasen eine zelluläre Funktion erfüllt.

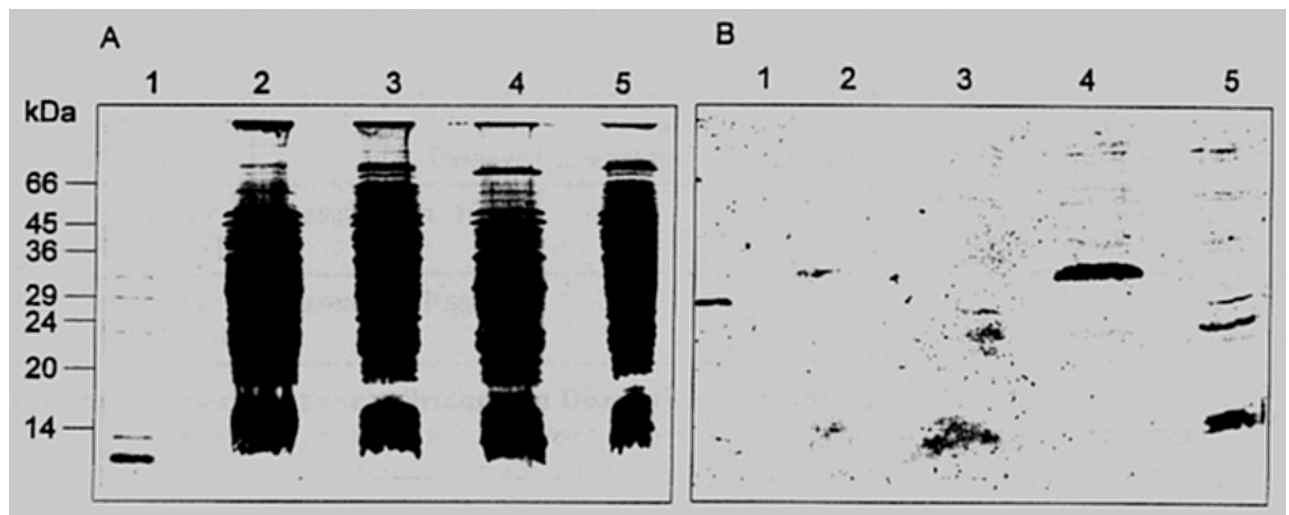


Abb. 10 Immunoblot-Analyse an Membranen von Streptomyceten zum Nachweis eines verkürzten FKBP33 nach Gendisruption mit pGM390SS

(A:) Coomassie gefärbtes 12,5%iges PAA-Gel

(B:) Western Blot mit Antikörpern gegen FKBP33 aus *S. chrysomallus*

Aufgetragen sind: 1 *S. chrysomallus*, 2 Membranen von *S. lividans*, 3 Membranen von *S. lividans* S390/2, 4 Membranen von *S. coelicolor* und 5 Membranen *S. coelicolor* S390/2

Mit den Ergebnissen der Immunodetektion ist zweifelsfrei erwiesen, daß es sich bei *S. lividans* S390/2 und *S. coelicolor* S390/2 um Disruptionsmutanten von *fkfB* handelt. Allerdings scheint der Verlust der C-terminalen Domäne zu keinen nachweisbaren Phänotyp zu führen.

Da all diese Ergebnisse eine korrekte Integration von pGM390SS in *fkfB* belegen, wurden abschließend Messungen der cytosolischen PPIase-Aktivität durchgeführt. Von der Organisation des *fkf* Genclusters in *S. chrysomallus* wurde eine transkriptionelle Kopplung der beiden Gene postuliert [Pahl and Keller, 1994]. In diesem Fall sollte in *fkfB* Disruptionsmutanten auch das *fkfA* Gen nicht mehr exprimiert werden können. Somit sollte auch keine cytosolische durch FK506 hemmbare PPIase-Aktivität nachweisbar sein. Alle getesteten *S. coelicolor* Mutanten wiesen im Vergleich zum Wildtyp keine Unterschiede ihrer FKBP12-Aktivität auf, d. h. alle Mutanten enthielten noch das cytosolische FKBP12 (Daten nicht gezeigt). Eine transkriptionelle Kopplung der Gene liegt somit zumindest in *S. coelicolor* nicht vor.

Bei analog durchgeführten Disruptionsexperimenten mit pGM340HE, war die Rekombinationsfrequenz erneut deutlich geringer als im Falle von pGM390SS. Die Integration von pGM340HE in den für die erste Domäne kodierenden Bereich des *fkB* Gens von *S. coelicolor* und *S. lividans* sollte zu einem vollständigen Verlust der Aktivität von FKBP33 führen. Es resultierten in zwei unabhängigen Experimenten die folgenden Daten.

Stamm Plasmid	30°C Tsr	39°C Tsr 1. Passage	39°C Tsr 2. Passage	39°C Tsr 3. Passage	39°C Tsr 4. Passage	39°C Tsr Flüssigkultur
<i>S. coelicolor</i> pGM340HE (I)	Rasen	ca. 1000	75	12	0	0
<i>S. coelicolor</i> pGM340HE (II)	Rasen	Rasen	280	25	1	1

Tabelle 5: Experiment zur vollständigen Disruption von *fkB* in *S. coelicolor*

Dargestellt ist das Ergebnis zweier Experimente. Aufgelistet ist jeweils die Anzahl der thiostreptonresistenten Kolonien.

Wie schon in Experimenten mit pGM177NS, ließ die geringe Rekombinationsfrequenz auf ektopische Vektorintegrationen schließen. An chromosomaler DNA des einzigen Tsr resistenten Klons wurde eine PCR zur Amplifikation von *fkB* durchgeführt. In dieser Mutante war das Gen unverändert zum Wildtyp nachweisbar (Daten nicht gezeigt). Dies läßt vermuten, daß die Mutation der ersten Domäne von FKBP33 möglicherweise entscheidenden Einfluß auf die Überlebensfähigkeit der Streptomyceten unter den gewählten Bedingungen hat. Somit werden nur ektopische Integrationen bei Gendisruptionsexperimenten erfaßt.

Da mit dem beschriebenen System zur Gendisruption keine FKBP12 defizienten Mutanten erhalten werden konnten und es weiterhin auch nicht möglich war FKBP33 vollständig zu inaktivieren, sollten in einem zweiten Ansatz die Gene durch Resistenzmarker vollständig ausgetauscht werden. Mit diesem System wäre man in der Lage, z.B. temperatursensitive Mutationen zu identifizieren.

4.1.2 Replacement von *fkBA* und *fkBB* Streptomyceten

Für die Herstellung von Genereplacement Mutationen der *fkB* Gene von *S. coelicolor* wurden, ausgehend von Cosmid I41 wie in Abb. 4 dargestellt, Plasmide konstruiert, die jeweils ca. 2 kb der entsprechenden 5'- und 3'- Bereiche des *fkBA* und *fkBB* Gens enthielten. In diesen Plasmiden war das gesamte betreffende *fkB* Gen durch eine Resistenzkassette ausgetauscht worden.

Zur Konstruktion wurden die flankierenden Bereiche beider Gene mittels PCR amplifiziert. Folgende Primer kamen dabei zum Einsatz:

fFK33/12N: 5'-TGCTCGCGGGTGAAATTCTCGCGCCGT-3'
 rFK33N: 5'-CGGTGGGGGAGCTCGTATCGGTATCGGT-3'
 rFK12N: 5'-TGCTCACGTGTTGAGCTCCTGCTTGTCT-3'
 fFK33C: 5'-CTCCGTGGGCATGCTCGCGAAGATGTGA-3'
 fFK12C: 5'-ACCTCGCATGCGGCGACCAGAGCCCCGGC-3'
 rFK33/12C: 5'-CCTCAAGCTTCGAATTCGCCCGCAGCAGCG-3'

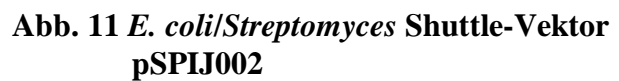
Die Primer wurden entsprechend Tabelle 6 mit Cosmid I41 als Template in der PCR eingesetzt. Die amplifizierten Fragmente wurden schrittweise über die neu eingeführten Restriktionschnittstellen in pTZ18U kloniert. Die entstandenen Plasmide enthalten ca. 2 kb der flankierenden 3'- und 5'-Bereiche der Gene *fk bA* und *fk bB*. Diese Abschnitte sind durch den nahezu vollständig erhaltenen Polylinker von pTZ18U getrennt. Dadurch ist es sehr leicht möglich, die Resistenzkassette zu wechseln oder sie in zwei verschiedenen Orientierungen einzubauen (siehe Tabelle 2 oder Abb. 4). Weiterhin enthalten die fertigen Konstrukte 5' und 3' je eine *EcoRI* Schnittstelle. Dadurch ist es möglich, nur den klonierten Bereich, inclusive der Resistenzkassette, als *EcoRI*-Fragment zur Transformation einzusetzen oder in andere Vektoren zu klonieren.

Fragment	forward Primer	reverse Primer	Fragmentgröße
5' <i>fk bB</i>	fFK33/12N	rFK33N	1896 bp
3' <i>fk bB</i>	fFK33C	rFK33/12C	1982 bp
5' <i>fk bA</i>	fFK33/12N	rFK12N	2970 bp
3' <i>fk bA</i>	fFK12C	rFK33/12C	1539 bp

Tabelle 6: PCR Fragmente zur Herstellung von I41 abgeleiteten Replacementkonstrukten

Zum Genreplacement wurden zwei Strategien verfolgt. In ersten Experimenten wurden die durch *EcoRI*-Verdau erhaltenen Fragmente aus den entsprechenden *E. coli* Plasmiden direkt zur Transformation von *Streptomyces* eingesetzt. Für beide Gene, *fk bA* und *fk bB*, ergab dieses Vorgehen, sowohl in *S. coelicolor* wie auch in *S. lividans* keine antibiotikaresistenten Kolonien.

Um die dafür möglicherweise verantwortliche Restriktionsbarriere der beiden Streptomyceten zu umgehen, wurde das entsprechende *EcoRI*-Fragment aus den pTZ18U Derivaten in den *E. coli* / *Streptomyces* Shuttle-Vektor pSPIJ002 (Abb. 11) umklont.



Nach der Anzucht der plasmidtragenden Stämme ohne Selektionsdruck für 3 Tage wurden diese in verschiedenen Verdünnungsstufen auf R5 Agarplatten mit Neomycin (50 µg/ml) im Falle von *fkfA*-Replacementexperimenten oder auf R5 Agarplatten mit Erythromycin (50 µg/ml) im Falle von *fkfB*-Replacementexperimenten ausgestrichen. Platten mit Einzelkolonien wurden auf R5 Agarplatten mit Thiostrepton/Neomycin bzw. Thiostrepton/Erythromycin repliziert. Nur gegen Erythromycin oder Neomycin einfachresistente Kolonien sollten nach einem Doppelcrossover die entsprechenden Gene für FKBP12 und FKBP33 durch die Resistenzkassette ausgetauscht haben und sollten auch keine autonomen Plasmide mehr tragen.

In keinem der durchgeführten Experimente konnten jedoch einzelresistente Kolonien erhalten werden. Dies untermauert die These, daß beide FKBP's in Streptomyceten möglicherweise essentielle Funktionen haben.

Weitere wichtige Vertreter der Actinomyceten sind die Mycobakterien. In Zusammenarbeit mit Prof. Sahm (Jülich) war das FKBP12 aus *Corynebacterium glutamicum* charakterisiert worden. Es zeigte in seiner Sequenz und den enzymatischen Eigenschaften eine hohe Ähnlichkeit zu FKBP12 aus *S. chrysomallus*. Die Möglichkeit der genetischen Analyse in *C. glutamicum*, einem einzellig wachsenden Actinomyceten, ließ uns auf die Familie der Mycobakterien aufmerksam werden. Der schnellwachsende Vertreter *Mycobacterium smegmatis* ist genetisch sehr gut charakterisiert und der genetischen Analyse zugänglich. Er dient zusätzlich als Modell pathogener Mycobakterien wie *M. tuberculosis* und *M. leprae*. Die mögliche Involvierung von FKBP's in pathogene Mechanismen, wie sie z.B. für MIPs in *Legionella pneumophila* beschrieben sind, sowie die Unterschiede zwischen schnell- und langsamwachsenden Mycobakterien veranlaßten uns, diese Organismen auf ihre Ausstattung mit FKBP's zu untersuchen und deren mögliche zellulären Funktionen zu analysieren.

4.2 Charakterisierung eines FK506 Bindungsproteins aus *Mycobacterium smegmatis*

4.2.1 Isolierung einer FK506 hemmbaren PPIase aus *M. smegmatis*

Zellextrakte von *M. smegmatis*, gewachsen bei 37°C in HMG, wurden in Western Blots mit Antikörpern gegen das cytosolische FKBP12 aus *Streptomyces chrysomallus* eingesetzt, um ein analoges Protein auch in diesem Organismus nachweisen zu können. Wie in Abb. 12 zu erkennen weisen die untersuchten Extrakte aus unterschiedlichen Wachstumsphasen starke Kreuzreaktivitäten mit dem eingesetzten Antikörper auf. Die Größe der immunreaktiven Bande liegt im Bereich von 30 kDa. Ein dem FKBP12 von *S. chrysomallus* analoges Protein ist in diesen Blots nicht nachweisbar.

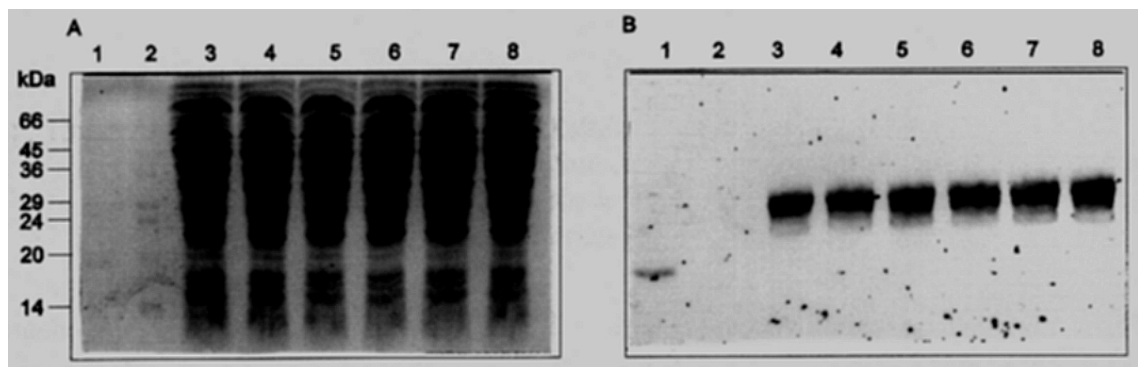


Abb. 12 Immunodetektion von *M. smegmatis* Zellextrakten mit Antikörpern gegen FKBP12 aus *Streptomyces chrysomallus*

M. smegmatis wurde in HMG bei 37°C angezogen und nach verschiedenen Zeiten wurden Proben entnommen und aufgeschossen. Die Trennung der Proteine erfolgte in einem 10%igen Polyacrylamidgel. Zur Immunodetektion wurde der anti-FKBP12 Antikörper aus Kaninchen in einer 1:2000 Verdünnung eingesetzt.

A: Coomassie gefärbtes Gel

B: Western Blot mit Antikörpern gegen FKBP12 aus *S. chrysomallus*

- | | |
|----------------------------|----------------------------|
| 1 <i>S. chrysomallus</i> | 5 <i>M. smegmatis</i> 36 h |
| 2 Molekulargewichtsmarker | 6 <i>M. smegmatis</i> 48 h |
| 3 <i>M. smegmatis</i> 12 h | 7 <i>M. smegmatis</i> 68 h |
| 4 <i>M. smegmatis</i> 24 h | 8 <i>M. smegmatis</i> 76 h |

Um die Anwesenheit einer FK506 hemmbaren PPIase zu beweisen, wurde der Extrakt, der aus 48 Stunden alten Zellen erhalten wurde, im Chymotrypsin gekoppelten PPIase-Test analysiert. Als Substrat wurde Suc-Ala-Leu-Pro-Phe-pNA gewählt, da das FKBP12 aus *S. chrysomallus*, wie die meisten FKBP, eine hohe Spezifität für Substrate mit Phenylalanin oder Leucin auf der Iminoseite vom Prolin besitzen. Die Messungen ergaben für das Substrat eine spezifische Aktivität von 93 BE/mg (3.11.7). Bei der Zugabe von 40 µM CyclosporinA sank diese Aktivität um 18% auf 72 BE/mg. Das deutet auf die Anwesenheit mindestens eines cytosolischen Cyclophilins in *M. smegmatis* hin. Bei der Zugabe von 20 µM Rapamycin ist

hingegen eine drastische Inhibierung um 84% (15 BE/mg) zu beobachten. Diese Messungen zeigen deutlich, daß *M. smegmatis* mindestens eine cytosolische PPIase der FKBP-Familie enthält.

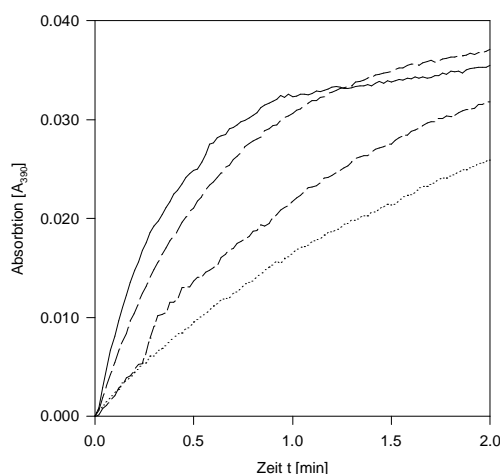


Abb. 13 PPIase-Aktivität in *M. smegmatis* Zellextrakten.

Die Messungen erfolgten mit Suc-Ala-Leu-Pro-Phe-pNA im Chymotrypsin gekoppelten Assay bei 10°C. Kontrolle ohne PPIase, — Rohextrakt (45 µg Protein), -- Rohextrakt + 30 µM CsA, -.- Rohextrakt + 3 µM Rapamycin

Ausgehend von diesen Ergebnissen wurde *M. smegmatis* in 4 x 400 ml HMG bei 37°C 48h angezogen. Die Zellen wurden aufgeschlossen und der gewonnene Überstand über eine zuvor äquilibrierte DEAE-Zellulose Säule gegeben. In einem linearen 500 ml Gradienten von 0-1 M NaCl erfolgte die Elution der gebundenen Proteine. Fraktionen zu je 5 ml wurden anschließend auf ihre PPIase-Aktivität untersucht. Im Bereich von 150 mM NaCl war eine nicht durch CsA, jedoch durch FK506 und Rapamycin vollständig hemmbare PPIase-Aktivität nachzuweisen. Außerhalb dieses Bereiches gab es keine weiteren durch FK506 hemmbaren PPIase-Aktivitäten. Die PPIase-haltigen Fraktionen wurden vereinigt und in einer Amicon-Zelle mit PM10 Membran unter Stickstoff aufkonzentriert. Anschließend erfolgte eine Gelfiltration über eine SuperdexTM75-Säule. Im Fraktionierungsbereich von 15-25 kDa konnte die PPIase-Aktivität lokalisiert werden. Die in Abb. 12 erkennbare ursprüngliche immunreaktive Bande korreliert somit nicht mit der PPIase Aktivität von *M. smegmatis*, sondern repräsentiert ein unbekanntes Protein. Die vereinigten PPIase-Aktivität enthaltenden Fraktionen wurden nun auf eine ResourceQ gebunden und anschließend in einem NaCl-Gradienten (0-1M) eluiert (

Abb. 14).

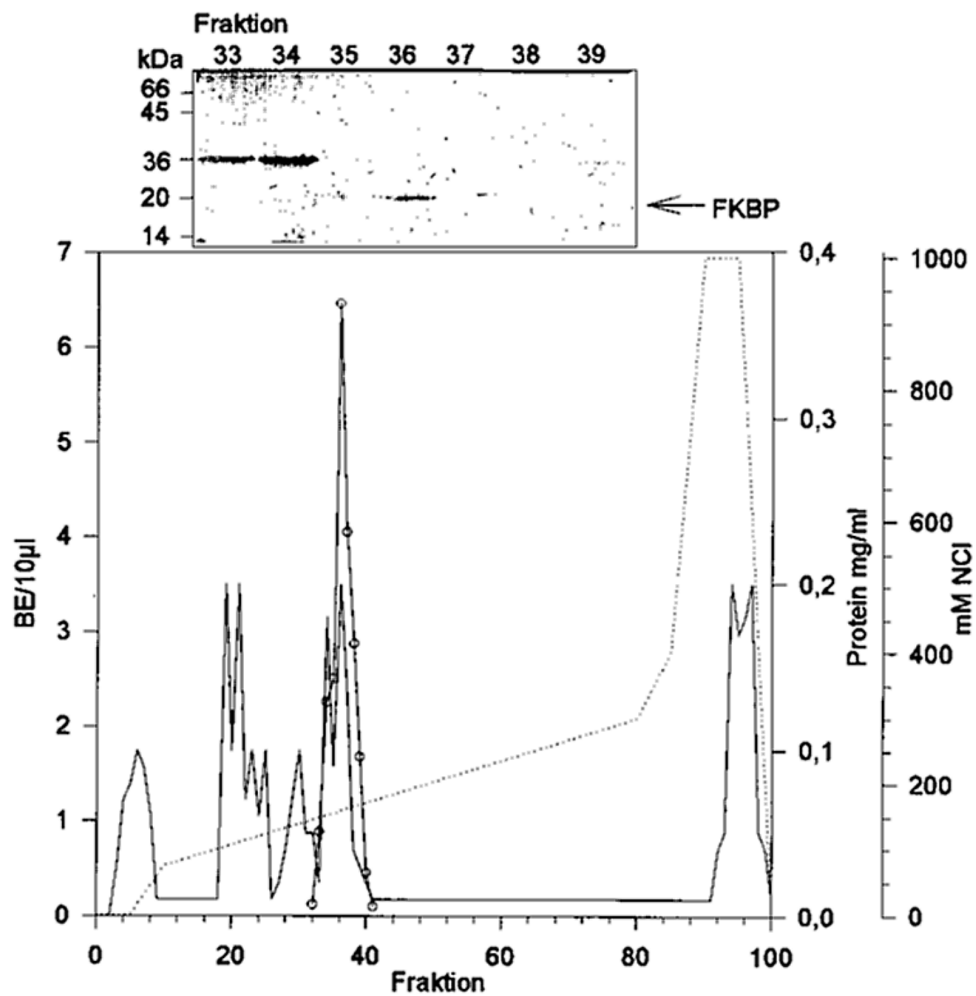


Abb. 14 Elutionsprofil der ResourceQ bei der Reinigung des FKBP aus *M. smegmatis*

A: Trennung der Fraktionen im 15%igen PAA-Gel, Coomassiefärbung

B: Elutionsprofil der ResourceQ, — Proteinkonzentration, —o— PPIase-Aktivität, NaCl-Gradient

Ab diesem Reinigungsschritt war es möglich, die Aktivität einer Proteinbande von ca. 20 kDa im SDS-Gel zuzuordnen. In der folgenden Tabelle ist die Bilanz der einzelnen Reinigungsschritte dargestellt.

Reinigungsschritt	Volumen (ml)	Protein (mg)	Units ^a (BE)	Spez. Aktivität ^a (BE/mg)	Reinigungs-faktor	Ausbeute (%)
Zellextrakt	45	640	62700	98	1	100
DEAE-Cellulose	27	230	32400	141	1,44	51,6
Superdex TM 75	19	1,5	22800	15.000	153	36,4
ResourceQ	8	0,4	15300	36800	375	24,4

^a BE = $(k_{\text{obs}}/k_{\text{un}}) - 1$

Tabelle 7: Reinigungsschritte zur Isolation des cytosolischen FKBP aus *Mycobacterium smegmatis*

Die Proteinbestimmung erfolgte nach Bradford. Die Messung der PPIase-Aktivität wurde im Chymotrypsin gekoppelten Test mit Suc-Ala-Leu-Pro-Phe-pNA bei 10°C durchgeführt.

Das cytosolische FKBP aus *M. smegmatis* wurde wie in Abb. 15 zu erkennen ist, zur weitgehenden Homogenität gereinigt.

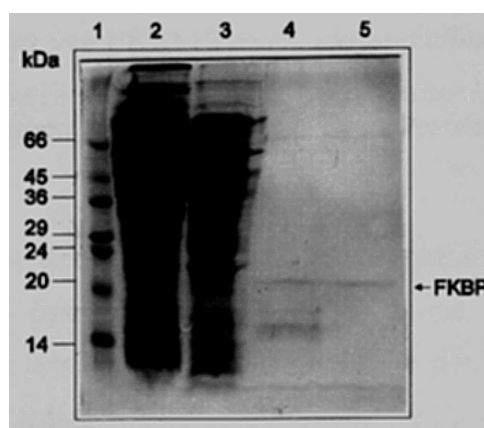


Abb. 15 Reinigung von cytosolischem FKBP aus *M. smegmatis*

Die Proteinproben wurden auf einem 15% PAA-Gel getrennt und Coomassie gefärbt

1 Molekulargewichtsmarker	4 Proteinpool nach Superdex TM 75
2 Rohextrakt	5 gereinigtes FKBP12 nach ResourceQ
3 Proteinpool nach der DEAE Zellulose	

Die am höchsten angereicherte Proteinfraction wurde aufkonzentriert und auf einem präparativen 15% SDS-Polyacrylamidgel getrennt. Die der Aktivität zugeordnete Bande von 20 kDa wurde nach Coomassie-Färbung ausgeschnitten und tryptisch verdaut. Die tryptischen Fragmente wurden mittels HPLC getrennt. Die Aminosäuresequenz einzelner Peptide wurde durch Edman-Abbau bestimmt. Parallel wurde von dem auf PVDF-Membran geblotetem Protein der N-Terminus bestimmt. Folgende Peptidsequenzen wurden erhalten:

N-Terminus: (M)TSTEKPEV
 Peptid 1: YVTVTYDTGEEFDVSN
 Peptid 2: GLIQGWQDGIPGMR

Der Vergleich der erhaltenen Peptidequenzen über die gesamte Sequenz von FKBP12 aus *S. chrysomallus* zeigt sehr starke Ähnlichkeiten der Aminosäuresequenzen am Aminoterminal und in den beiden C-terminal gelegenen Bereichen der sequenzierten Peptide. Das weist darauf hin, daß es sich bei dem gereinigten und sequenzierten Protein tatsächlich um ein FKBP handelt.

```

1  M-SIEKPEVDFFPGGEPPADLAIKDIWEGDGPVAQAGQTVSVHYVGVAFASTGE  50
   MTSTEKPEVEF                                             QAYVTVTYDTGE
   * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
51  FDASSWNRGTPLQFQLGAGQVISGWDQGVQ-GMKVGGRRELIIPAHLAYGDR 100
   EFDVS-N                                             G-LIQGW-QDGIPGMR
   ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
101 GAGGGKIAPGETLIFVCDLVAV 122

```

Abb. 16 Sequenzvergleich von Teilsequenzen des FKBP aus *M. smegmatis* mit der Aminosäuresequenz von FKBP12 aus *S. chrysomallus*.

Die Sterne symbolisieren die identischen Aminosäuren zwischen den durch Edmanabbau erhaltenen Peptidsequenzen und der Proteinsequenz von FKBP12 aus *S. chrysomallus*.

Erstaunlicherweise ergab die Recherche in den Sequenzdatenbanken der Genomprojekte von *M. tuberculosis* und *M. leprae* keinen Hinweis auf die Anwesenheit eines FK506 Bindungsproteins bei beiden langsamwachsenden Vertretern der Mycobakterien. Wir stellten fest, daß diese Organismen lediglich Cyclophiline enthalten. Es war deshalb naheliegend, das Gen des FKBP aus *M. smegmatis* zu klonieren, seine chromosomale Lokalisierung zu bestimmen und eventuell herauszufinden, ob oder warum das Gen nur in schnellwachsenden Mycobakterien wie *M. smegmatis* vorkommt.

4.3 Klonierung des *fkB* Gens aus *M. smegmatis*

Ausgehend von den Peptidsequenzen wurden folgende Oligonukleotide unter Verwendung des für Actinomyceten typischen Codongebrauchs abgeleitet.

Smeg22f.: 5'-TAC GTC AAC GTG ACC TAC GAC ACC GGC GAG GAG TTC-3'
 Y V (T) V T Y D T G E E F

Durch die Einführung einer Punktmutation im ACC-Codon für Tyrosin konnte zusätzlich eine *HincII* Schnittstelle eingeführt werden.

Smeg22r.: 5'-GCG CAT GCC CGG GAT GCC GTC CTG CCA GCC CTG GAT-3'
 R M G P I G D Q W G Q I

Durch die günstige Wahl der Codons war es in diesem Falle möglich eine *SmaI* Schnittstelle ohne zusätzliche Mutationen einzuführen.

Mit diesen Primern wurde eine PCR an chromosomaler DNA aus *M. smegmatis* durchgeführt. Wie aus Abb. 16 abzuleiten ist, war ein PCR-Fragment von etwa 130 bp zu erwarten. Die PCR wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Denaturierung:	1,0 min 95°C	
Annealing:	1,5 min 52°C	
Polymerisation:	1,5 min 72°C	35x

Das PCR-Gemisch wurde anschließend auf einem 2%igen Agarosegel getrennt. In Abb. 17 ist ein Fragment im erwarteten Größenbereich zu erkennen. Zusätzlich waren kaum Nebenprodukte im Größenbereich unter 1000 bp festzustellen, welche möglicherweise von Genen höhermolekularer FKBP's stammen könnten.

Das erhaltene ca. 150 bp PCR-Produkt wurde aus einem präparativen Agarosegel eluiert, mit *HincII* und *SmaI* geschnitten, danach mit *SmaI* geschnittenem pTZ18U ligiert und in *E.coli* DH5 α transformiert. Das resultierende Plasmid pMF150 wurde sequenziert. Die abgeleitete Aminosäuresequenz des PCR-Fragments zeigte starke Homologien zum FKBP12 aus *S. chrysomallus*. Diese Homologien lagen genau im Bereich zwischen den Peptiden 1 und 2 (vgl. Abb. 16).

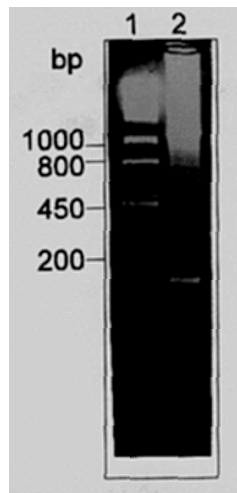


Abb. 17 PCR an chromosomaler DNA aus *M. smegmatis* zur Amplifikation eines internen Fragmentes des *fkf* Gens

Die Amplifikation des internen Fragmentes des *fkf* Gens erfolgte mit den Primern Smeg22f und Smeg22r und chromosomaler DNA von *M. smegmatis* als Template. Nach 35 Zyklen mit Denaturierung 1 min 95°C, Anlagerung 1,5 min 52°C und Polymerisation 1,5 min 72°C wurde der PCR-Ansatz in einem 2%iges Agarosegel getrennt.

1 λ -DNA *Pst*I verdaut

2 10 μ l PCR Ansatz

Diese Daten wiesen daraufhin, daß ein internaler Bereich des *fkf* Gens aus *M. smegmatis* amplifiziert worden war, und daß dieses Gen sehr wahrscheinlich für das zuvor gereinigte Protein kodiert.

Das Insert aus pMF150 konnte somit als Sonde zur Klonierung des *fkf* Genlocus eingesetzt werden. Nach der Markierung mit [α -³²P]-dCTP wurde die Sonde zur Hybridisierung in Southern Blots chromosomaler DNA aus *M. smegmatis*, die mit verschiedenen Restriktionsenzymen behandelt wurde, eingesetzt. Abb. 18 zeigt das Autoradiogramm der Southern Hybridisierung nach der Hybridisierung bei 55°C.

Da unter der gewählten geringen Stringenz in jeder Spur jeweils nur ein Hybridisierungssignal zu erkennen war, konnte davon ausgegangen werden, daß das *fkf* Gen nur als „single copy“ im Genom von *M. smegmatis* vorliegt.

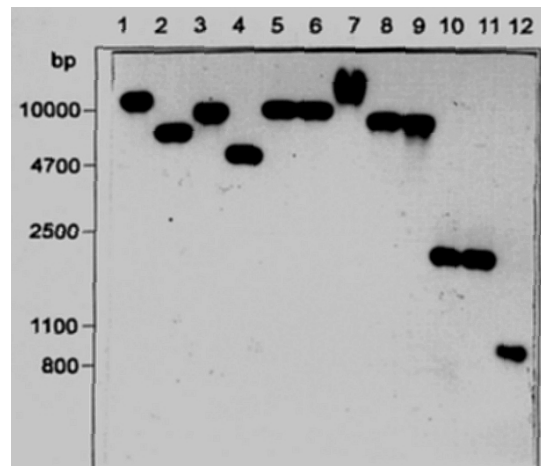


Abb. 18 Autoradiogramm der Southern Hybridisierung von chromosomaler DNA aus *M. smegmatis*

Auf einem 0,8%igen Agarosegel wurden je 10 µg chromosomaler DNA aus *M. smegmatis* nach der Behandlung mit verschiedenen Restriktionsenzymen aufgetragen. Als Sonde diente das radioaktiv markierte Insert von pMF150. Die Membran wurde bei 55°C hybridisiert und bei 55°C mit 2xSSC + 0,1% SDS gewaschen.

1 <i>EcoRI</i>	6 <i>BamHI/HindIII</i>	11 <i>SstI</i>
2 <i>EcoRI/BglII</i>	7 <i>HindIII</i>	12 <i>SstI/XhoI</i>
3 <i>BglII</i>	8 <i>HindIII/PstI</i>	
4 <i>BglII/</i>	9 <i>PstI</i>	
5 <i>BamHI</i>	10 <i>PstI/SstI</i>	

Zur Klonierung eines das gesamte Gen überspannenden DNA-Fragments wurde aus dem *EcoRI/BglII* Restriktionsansatz der Fraktionierungsbereich von etwa 5-5,4 kb ausgeschnitten. Nach der Elution aus dem Agarosegel wurde in *EcoRI/BamHI* geschnittenen pTZ18U ligiert und in *E.coli* DH1 transformiert. Etwa 5000 Kolonien wurde einer Koloniehybridisierung unterzogen. Bei der Hybridisierung mit dem [α^{32} P]-dCTP markierten Fragment aus pMF150 konnten 3 hybridisierende Kolonien identifiziert werden. Die isolierten Plasmide pMF11 und pMF31 trugen Inserts von ca. 5,3 kb. Das Insert von pMF21 entsprach mit ca. 1 kb nicht der erwarteten Größe. Die Plasmide pMF11 und pMF31 wurden in Southern Blots analysiert. Hierbei zeigten pMF11 und pMF31 das selbe Restriktions- und Hybridisierungsmuster (Abb. 19). Beide enthielten somit wahrscheinlich den selben Abschnitt des *M. smegmatis* Chromosoms.

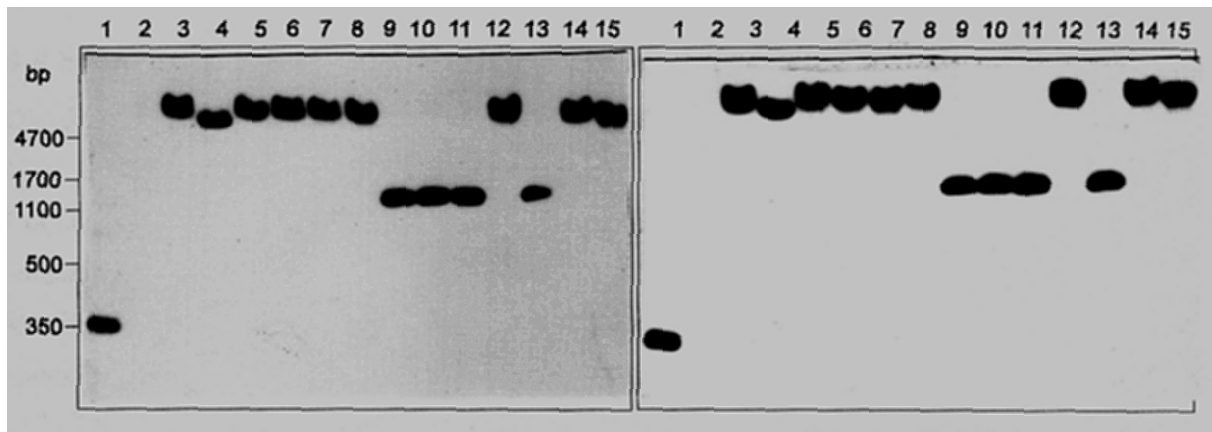


Abb. 19 Southern Hybridisierung von pMF11 und pMF31

Auf einem 0,8%igen Agarosegel wurden jeweils ca. 1 µg Plasmid DNA nach der Behandlung mit verschiedenen Restriktionsenzymen getrennt. Die Membran wurde bei 65°C hybridisiert und bei 65°C mit 0,1xSSC + 0,1% SDS gewaschen

A: pMF11 **B:** pMF31

1 <i>SalI</i>	5 <i>BamHI</i>	9 <i>PstI/SstI</i>	13 <i>HindIII/SstI</i>
2 λ -DNA <i>PstI</i>	6 <i>HindIII</i>	10 <i>SstI</i>	14 <i>HindIII/XbaI</i>
3 <i>EcoRI</i>	7 <i>HindIII/PstI</i>	11 <i>SstI/XbaI</i>	15 <i>PstI/XbaI</i>
4 <i>EcoRI/BamHI</i>	8 <i>PstI</i>	12 <i>XbaI</i>	

Das 5,3 kb Insert von pMF11 wurde im Folgenden durch Restriktion mit verschiedenen Endonukleasen kartiert und anschließend subkloniert. Die Subklone wurden entsprechend Abb. 20 sequenziert. Die Analyse der Sequenzdaten ergab das Vorhandensein von fünf offenen Leserahmen, von denen einer nur noch unvollständig auf dem Plasmid lokalisiert ist. Damit ergab sich für den *fkf*-Genlocus aus *M. smegmatis* die nachfolgend dargestellte Organisation.

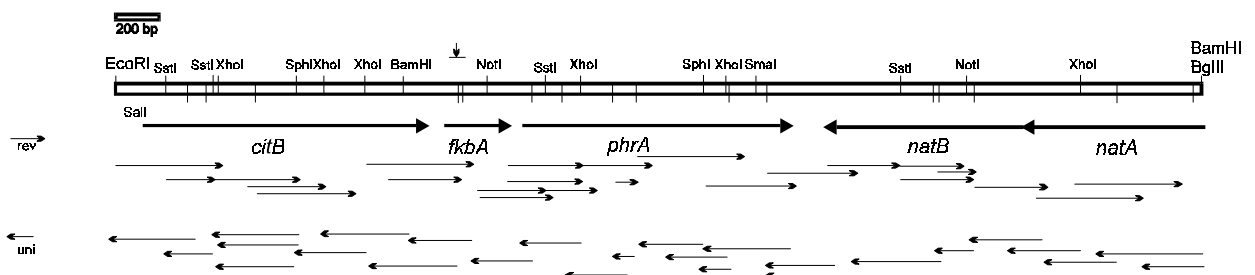


Abb. 20 Organisation und Sequenzierungsstrategie des *fkf* Genlocus aus *M. smegmatis*

Ergebnis der Restriktionsanalyse von pMF11 am Beispiel ausgewählter Restriktionsenzyme. Der senkrechte Pfeil markiert den hybridisierenden Bereich von pMF150. Im unteren Teil sind die an Subklonen durchgeführten Sequenzreaktionen (uni: Sequenzreaktion mit dem „universal cycle Primer“, rev: Sequenzreaktion mit dem „reverse cycle Primer“). Nachfolgend charakterisierte offene Leserahmen sind durch dicke Pfeile gekennzeichnet.

4.4 Sequenzanalyse des *fbk* Genlocus aus *M. smegmatis*

Die durchgängig doppelsträngige Sequenzierung des 5258 bp Inserts von pMF11 ergab mit 67% den für Actinomyceten typischen hohen G+C-Gehalt. Aufgrund des typischen Codongebrauchs innerhalb dieser Organismengruppe war es möglich, codierende Bereiche anhand des erhöhten G+C-Gehaltes in der dritten Position eines jeden Codons (ca. 90%) zu identifizieren [Wright and Bibb, 1992]. In der folgenden Abbildung sind die Sequenz und die identifizierten offenen Leserahmen in ihrer Aminosäuresequenz wiedergegeben.

<i>EcoRI</i>	----->	-35	
1	<u>GAATTC</u> GCACCTCAGGTGGCTGCGATCACGGTCTCGCGTCCGGGTGCAGACCTCCTTGG	<u>GCAAGC</u>	66
	-10	<-----	
67	GAGCTGAGAAGCGGCTAGTTATAGCTGTGTGTCTACCCGGACACTGTCAAACTTCTGATTCTGA		132
	RBS		
133	ATAAGGGGTTCTGTGTATGCTCAAACAGTCCCAGCCGACCAGGCGTCCGACACGGCCTCAGCGTA		198
	<i>citB</i> --> M C M L K Q S Q P T R R P T R P Q R		
	<i>SstI</i>		
199	CCTTCACCTACCCCGGTGGAAAGCTGGAGCTCCGATCCTGAAGGCCACCGAGGGGACAGACTCGG		264
	T F T Y P G G K L E L P I L K A T E G T D S		
265	TCGCTCTCGGCAAGTTCCTGGCCGAGACAAACCTGACCACGTTTCGACAGTGGGTTTCATGAACACCG		330
	V A L G K F L A E T N L T T F D S G F M N T		
331	CGTCGACGAAGTCGGCCATCACCTACATCGACGGTGAGCAGGGCATCCTCCGCTACCGGGGCATCC		396
	A S T K S A I T Y I D G E Q G I L R Y R G I		
	<i>SstI</i>		
397	CGATCGAGCAGCTCGCGGAGAAGTCGACCTTCATCGAGGTGAGCTACCTGCTCATCTACGGCGAGC		462
	P I E Q L A E K S T F I E V S Y L L I Y G E		
	<i>XhoI</i>		
463	TCCCGACCCCGACCCAGCTCGAGGAGTTACACACCAAGATCCAGCGGCACACCCTGCTGCACGAGG		528
	L P T P T Q L E E F T T K I Q R H T L L H E		
529	ATCTCAAGCGCTTCTTCGACGGCTTCCCCCGCAACGCGCACCCCATGCCGGTGCTGTGCGAGCGCGG		594
	D L K R F F D G F P R N A H P M P V L S S A		
595	TCAACGCCCTGTGCGCCTACTACCAGGACTCGCTCGATCCCAAGGACGACGAGCAGGTCGAGCTGT		660
	V N A L S A Y Y Q D S L D P K D D E Q V E L		
661	CGACCATCCGCCTCCTGGCGAAGCTGCCGACCATCGCCGCCTACGCCTACAAGAAGTCGCCCGGTC		726
	S T I R L L A K L P T I A A Y A Y K K S A G		
727	AGCCTTTCCTGTACCCGGACAACCTCGCTGAGCCTCGTCGAGAATTCCTGCGGATGACCTTCGGCT		792
	Q P F L Y P D N S L S L V E N F L R M T F G		
793	TCCCGCGCGAGCCCTACGAGGTCAACCCGGATGTCGCCAAGGCGCTCGACATGCTGTTTCATCCTGC		858
	F P A E P Y E V N P D V A K A L D M L F I L		
	<i>SphI</i>		
859	ATGCCGACCACGAGCAGAACTGCTCGACCTCGACCGTCCGCCTCGTCGGCTCGTCGAGGCCAACCC		924
	H A D H E Q N C S T S T V R L V G S S Q A N		
925	TCTTCACCTCGATCTCGGGCGGCATCAACGCCCTCTGGGGCCCGCTGCACGGCGGCGCCAACCAGG		990
	L F T S I S G G I N A L W G P L H G G A N Q		
	<i>XhoI</i>		
991	CGGTCCTCGAGATGCTCGACGCCATCAAGGCCGACGGCGGCGACACCAAGAAGTTCATGGAGCGGG		1056
	A V L E M L D A I K A D G G D T K K F M E R		
1057	TCAAGAACAAGGAAGCCGGCGTCAAGCTGATGGGCTTCGGTCACCGCGTCTACAAGAACTACGATC		1122
	V K N K E A G V K L M G F G H R V Y K N Y D		
1123	CGCGCGCCCGCATCGTGAAGAAGACCGCCGACCAGATCCTGGAACCCTCGGTGTCCAGGACGATC		1188
	P R A A I V K K T A D Q I L E T L G V Q D D		
	<i>XhoI</i>		
1189	TGCTCGAGATCGCCAAGGGTCTCGAAGAGGTGCGCCTCAACGACGACTACTTCATCGAGCGCAAGC		1254
	L L E I A K G L E E V A L N D D Y F I E R K		
1255	TGTACCCGAACGTGGACTTCTACACCGGTGTCATCTACCGTGCATGGGGCTTCCCGACGCGCATGT		1320
	L Y P N V D F Y T G V I Y R A M G F P T R M		

1321 TCACCGTTCTGTTTCGCGTTGGGTGCGCTTCCGGGCTGGATCGCCCACTGGCGTGAGATGCACGAGG 1386
 F T V L F A L G R L P G W I A H W R E M H E
 BamHI -35 -----> -----10-->---->
 1387 ATCCGACCAACCAAGATCGGCCGTCCGCGTCAGCTCTACACCGGC TACACCGAGCGCGACTACGTGC 1452
 D P T T K I G R P R Q L Y T G Y T E R D Y V
 <----->
 1453 CGATGAGCGATCGCTGAGCCGCTCGGTCCGATCCGCCCGGAACATCGACTGACCGCCGACTCAAA G 1518
 P M S D R *
 RBS
 1519 GAGAGTCCCAGTGACCAGCACCGAAAAAGCCCCGAGGTCGAGTTCAGGCGGGTCCGCCGCCGTCCGA 1584
 fkbA--> M T S T E K P E V E F Q A G P P P S E
 -----> <----->
 1585 GCTGACCATGACCGACCTGATCGTCCGTGAGGGCGCCGAAGCCGTGCGCGGCGGCGTCTGTCGACGT 1650
 L T M T D L I V G E G A E A V R G G V V D V
 1651 CCAC TACGTGGGTGTCGACTACGAGACCGCGAGGAGTTCGACTCATCGTGGGATCGTGGCCAGTC 1716
 H Y V G V D Y E T G E E F D S S W D R G Q S
 -----> -----> -35 <-->
 1717 GGCCAACTTCCCCTCGACCGGCTGATCCCGGCT GGCAGGAAGGCATCCCCGGCATGAAGTCCGG 1782
 A N F P L D R L I P G W Q E G I P G M K V G
 -10----->
 1783 CGGCCGCCCGCAGCTCACGTTCCGCCGAGCTGGCCTACGGGCCCGCGGCGCGGCCACCGGCT 1848
 G R R Q L T V P P E L A Y G P A G A G H R L
 RBS
 1849 GTCGGGACGCACCCTCGTGTTCGTCATCGACCTGCTCGGGGTGGCCT GACGGCCACCAACCTGGTG 1914
 S G R T L V F V I D L L G V A * phrA--> M
 1915 TGGCTCAGGCGCGACCTGCGCCTGGGTGACCTACCGGCGTTACAAGCTGCCAGAGGGACCGACGAT 1980
 W L R R D L R L G D L P A L Q A A R G T D D
 1981 TCGTCGGTCTTCTGTGCTTTGTGGTTCGACCTCGGCTGGCGCGGTCTCGGGGAGCGGCGGCTT 2046
 S S V L L C F V V D P R L A R S S G E R R L
 SstI
 2047 GCGTTCCTGTTTCGACTCGCTGCGC GAGCTCGACGACAAGCTCGACGGCCGGTTCGTCGTCGTCG 2112
 A F L F D S L R E L D D K L D G R L L V V R
 2113 GGGCGTCCCGACGAGGAGATCCCGCGTCTCGCGCGCCGTCGACGCGGAGGCCGTGCACATCTCG 2178
 G R P D E E I P R L A R A V D A E A V H I S
 2179 GCCGACTTCACCCCGTTCCGGCAGACGCCGCGACGAGGCGGTGCCGAAGCCCTCGGCGAGGTGCCG 2244
 A D F T P F G R R R D E A V A E A L G E V P
 XhoI
 2245 CTCGAGCGCAGGGATCTCCGTATCTGGTCTCGCCGGGACGTATCACGAAGGACGACGGCGAACCG 2310
 L E A T G S P Y L V S P G R I T K D D G E P
 2311 TACAAGGTGTTTCACGCCGTTCTTCCGCCGTTGGCGCGACCACGGGTGGCGCAGGCCCGCAGAGTCC 2376
 Y K V F T P F F R R W R D H G W R R P A E S
 2377 TCGGTGCCGTCTCTGCGGTGGTTCGACCCGGCGGACATCGCGAACAGCGGGCGGATCGCCGTCCCG 2442
 S V P S S A V V D P A D I A N S G R I A V P
 2443 ACGGCGCCGGTGAAGCTGTCTTCCCGCCGGGGAGGACGCCGCGCGCAACGCTGGGCGGAGTTC 2508
 T A P V K L S F P A G E D A A R Q R W A E F
 2509 GTCGACGCCGACCTCGCCGACTATGACGAGATCCCGCAGACCCGGCCGCGACGCGACGAGCCGG 2574
 V D A D L A D Y D E I R D D P A A D A T S R
 2575 ATGTCGGCATATCTCAAGTACGGCAACATCCATCCCCGCACGCTCGCCGTTGATCTCGGGAAAGGC 2640
 M S A Y L K Y G N I H P R T L A V D L G K G
 2641 AAAGGGGCGCAGGCGTATCTGCGCGAACTGGCCTTCCGCGACTTCTACGCCGACGTCTCTGGCAC 2706
 K G A Q A Y L R E L A F R D F Y A D V L W H
 2707 TGGCCACACAGCTTGTGGCACAACCTGGAATCGTCCGTTTCGACGCCATCGAACTCGACACCGACGAC 2772
 W P H S L W H N W N R R F D A I E L D T D D
 2773 GCGGCATATGAGCGATTGAGGTGTGGAAGCCGGTTCGACCGGCTTTCCCTCGTGGATGCCG GC 2838
 A A Y E R F E V W K A G R T G F P L V D A G
 SphI
 2839 ATGCGGCAGCTCAACGAGACCGGCTGGATGCACAACCGGTTTCGCATGATACCGCGTCGTTCTCTG 2904
 M R Q L N E T G W M H N R V R M I T A S F L
 XhoI
 2905 GTGAAGGATCTCCACCTGCCATGGTGGTGGGGCGCGGAGTACTTC CTCGAGCAACTCGTCGACGGC 2970
 V K D L H L P W W W G A E Y F L E Q L V D G
 2971 GACATGGCCTCGAACAACCACGGCTGGCAGTGGGCTGCGGGCACGGGAACCGATGCGGCGCCGTAC 3036

D M A S N N H G W Q W A A G T G T D A A P Y
 3037 TTCCGGGTGTTCAACCCGACAGCGAGGCGAAGAAGTTCGACCCGAAGGGCGAGTACGTCCGCCGC 3102
 F R V F N P Q T Q A K K F D P K G E Y V R R
 SmaI
 3103 TGGGTGCGCGACGTGGAGGCCGACACTA CCGGGGCGCGATCGTCGACCACAGCGCCGAGCGGGCC 3168
 W V G D V E A D D Y P G P I V D H S A E R A
 3169 GAGGCGCTGCGGAGGTACGGCGAGATCGGCGAGGCGTAGAAACGGTGC GCGCATGTGCGTCTTTT 3234
 E A L R R Y G E I G E A *
 -----> <-----
 3235 CTACGAAATCCCCTTGAGCACCTCACCCAGCTCATGCGCGATCCGGTGCGCAGGATTGATCGCTG 3300
 GATGCTTTAGGGGAACTCGTGGAGTGGGGTCGAGTACGCGCTAGGCCACGCGTCTAACTAGCGAC
 * G L E H A I R H A P N I A P
 -----> <-----
 3301 GTAGATCCGCGCGTTCATCCAGGTGCGGCGCGCGCGTGCAGTGCCACAGCAGGAAGGTCACCACGA 3366
 CATCTAGGCGCGCCAGTAGGTCCAGCGCCGCGCGCACGGTCACGGTGTGCTCCTTCCAGTGTGCT
 L D A R D D L D R R G H W H W L L F T V V I
 3367 TCTGCTCGACGTCCGTGTGCGCAAGGGTGGCGATGCGGATCGGCATGAGTGCCGCGCTGAACGGCG 3432
 AGACGAGCTGCAGGCACAGCGGTTCCACCCTACGCCCTAGCCGCTACTACGGCGGACTTGCCGC
 Q E V D T D G L T A I R I P M L A A S F P P
 3433 GAATCCAGCTCAGCGTCTCGATGATCGTCAATCCAGTGCCACACCGAAGATCCCCGAGTACA. 3498
 CTTAGGTGCGAGTCGAGAGCTACTAGCAGCTTAGGTACGGACGTGTGGCTTCTAGGGGCTCATGT
 I W S L T E I I T S D L A Q V G F I G S Y L
 3499 GCACCGCCAGCGACAACACGGTCAGCGGCGCGGACGACGAGCTGAGTTCTCCTGCCGGGAGACGA 3564
 CGTGGCGGTGCTGTTGTGCGAGTCGCGCGCGGTGCTGCTCGACTCAAGGAGGACGGCCCTGTGCT
 V A L S L V T L P A S S S S L E E Q R S V I
 3565 TCGCGCCGACGCGGCGTAGAGGGACGCGAAGAACAAGACCCGAGCACGAACCATGCCAGCGAGG 3630
 AGCGCGGCTGCGCCGCTCTCCCTGCGCTTCTTGTCTTGGGCTCGTGCTTGGTACGGTCTGCTCC
 A G S A A Y L S A F F L F G L V F W A L S A
 3631 CCGCAACATGCTCACGCGCGCGCGGACGGTGAGGATGCCGGTGCCTGCCGATCACGG 3696
 GCGCTTGTACGAGTGCCGCGCGGCGCGGCTGCCACTCCTACGCCAGCGGAGGGGCGCTAGTGCC
 A F M S V A A G P V T L I G T A T G A I V A
 3697 CGGTGGCGCCGAGCAGGACCACTGCGTCAGCACGACGCGCCCGATGCCGATCACCTTGCCCCACA. 3762
 GCCACGCGGCTCGTCTGTTGGACGCGAGTCGTGCTGCGGGGCTACGGCTAGTGAACGGGGTGT
 T A G L L V V Q T L V V A G I G I V K G W M
 SstI
 3763 TCAGATGCAGCGGCTTGATCGTCGCCAGCAG GAGCTCGACGACGCGGAGGTCTTCTCCTCGACGA 3828
 AGTCTACGTGCGCGAAGTACGAGCGGTGCTCTCGAGCTGCTGCGCGCTCCAGAAGAGGAGCTGCT
 L H L P K I T A L L L E V V R S T K E E V V
 3829 CGCCGACGGCGACCATGGTGCCGCCCATCGTGATCGCGAGCATGAGCAGCACGAAACCGACCATGG 3894
 GCGGTGCGCGCTGGTACACGCGGGGTAGCACTAGCGCTCGTACTCGTCTGCTTTGGCTGGTACC
 G V A V M T G G M T I A L M L L V F G V M A
 3895 CGATGACGATCCGCTGGCCCTCGTCGGGCGGGGCTGGGTGCTACTGGTCACGGTGACGTGACCG 3960
 GCTACTGCTAGGCGACCGGAGCAGCCCGGCCGACCCAGCTATGACCAGTGCCACTGCAGCTGGC
 I V I R Q G E D P R A P D I S T V T V D V A
 3961 CGGGCAGGGAGGCGGCGTTCGACGCCCCGGTTCGGCGAGCGCGGGACAGGGCTCTTGGGACACCG 4026
 GCGGCTCCCTCCGCGCAGCTGCGGGGCGAGCGGCTCGCGCGCCCTGTCGCGGAGGACCTGTGGC
 P L S A A D V G R D A L A R S L A E Q S V A
 4027 CGGTGCGGATGGGCCCCCTCGACGCGCGGGTTCGATCCCGTCTTGCCGAGGATCACGTAGGAGCCGG 4092
 GCCACGCTACCCGGGAGCTGCCGGCCAGCTAGGGCAGGAACGGCTCCTAGTGCATCTCGGCC
 T R I P G E V A P D I G D K G L I V Y S G A
 4093 CGGTATGGCCGGGACGAGCGCGCGCGCAGCTCGCCGTGCGGAGACGAGCCGCTGGCCTCGTCA 4158
 GCCATACCGGCCCTGCTCGCGCGGCGCTGCAGCGGCAGCCTCTGCTCGGCGGACCGGAGCAGCT
 T H G P V L A A A V D G D S V L R R A E D V
 4159 CGGACGAGGCGGGTTCACATCGATGGTGGTGCCGGCCGAATCGGCGACGGCGACGATCGAGTCGG 4224
 GCCTGCTCCGCCCCAAGGTGTAGCTACCACCACGGCCGGCTTAGCCGCTGCGGCTGCTAGCTCAGCC
 S S A P E V D I T T G A S D A V A V I S D T
 4225 TGACCGATTGCGGCTGGGCGACGACGGCGATCTTCTCGGCGGAGTCGCCGCGGCGAAGATCCTGA 4290
 ACTGGCTAACGCCGACCCGCTGCTGCCGCTAGAAGAGCCGCTCAGCGGCGGCGCTTCTAGGACT
 V S Q P Q A V V A I K E A S D G G A F I R L
 4291 GCACGATGCCCCCGCGATCAGCAGGACCATCAGCAGCCCGGTGCTGACCAGGAACGACTTCGTCC 4356
 CGTGCTAGCGGGGCGCTAGTCGTCCTGGTAGTCGTGCGGCCACGACTGGTCTTGTGAAGCAGG


```

      V I A G A I L L V M L L G T S V L F S K T R
4357 GCACGCGGGTGGTGTATCTCGCGTTTCGGCGACCAGCCGGATCGCCTGCGCCGCGCCGGCGGGCGGGCG 4422
      CGTGCCCCACCCTAGAGCGCAAGCCGCTGGTCGGCCTAGCGGACGCGGCGCGGCCGCCGCCCGC
      V R T T I E R E A V L R I A Q A A G A A P P
4423 GGTTCGGGTGGTGGGGTCGTGGAGCACGGTCATGCGGAGACCACCTCTCGGAAGAGTTTCGGTCAG 4488
      CCAAGACCCACCACCCAGCACCTCGTGCCAGTACGCTCTGGTGGAGAGCCTTCTCAAGCCAGTC
      * A S V V E R F L E T L
      N Q T T P D H L V T M <--natB
4489 GGACGGGGCCGAGGTCGGAATCGGTGGACGGGTCCCTGTTCCAGTGCGGGCGGCGAGGATCTGCTG 4554
      CCTGCCCCGGCTCCAGCGCTTAGCCACCTGCCAGGGACAAGGTCACGCCGCCGCTCCTAGACGAC
      S P A S T A F R H V P G Q E L A A A L I Q Q
4555 GTCGTCGGCCAACTGCGGGTCGATGAGCAGCCGGGTGGTCTCTCCGTACTCGACGTCGCGCACGCC 4620
      CAGCAGCCGGTTGACGCCCAGCTACTCGTCGGCCACCAGAGAGGCATGAGCTGCAGCGCGTGCGG
      D D A L Q P D I L L R T T E G Y E V D R V G
      XhoI
4621 GGGCAGATGGTTCGGCCAGGCGGTGTTCGTACGCGGTCCGCTCAC CTGAGGGTGAGGCCGCTGCG 4686
      CCCGCTTACCAGCCGGGTCCGCCACAGCCATGCCAGGCGAGTGGAGCTCCCACTCCGCGCACGC
      P L H D A W A T D T R P G S V E L T L G S R
4687 TGTGCGCAGGTCTTCCACGGTGCCGAGCGCGCGCATCTCGCCGCGGGCGATGATCCCGACCCGATC 4752
      ACACGCGTCCAGAAGGTGCCACGGCTCGCGCGCTAGAGCGGCGCCCGCTACTAGGGCTGGGCTAG
      T R L D E V T G L A R M E G R A I I G V R D
4753 GCAGATCCGCTGCACGAGGTGCGAGCTGATGCGAGGAGAAGATCACCGGGATGCCCTCGGCCGCCCTT 4818
      CGTCTAGGCGACGTGCTCCAGCTCGACTACGCTCCTTCTTAGTGGCCCTACGGGAGCCGCGCGAA
      C I R Q V L D L Q H S S F I V P I G E A A K
4819 CTCCTTGAGGACGTCGCTCATCACGTGACGGCGACCGGGTCGAGTCCGGAGAACGGCTCGTCGAG 4884
      GAGGAACCTCTGCAGCGAGTAGTGACGCTGCCGCTGGCCCCAGCTCAGGCCTCTTGCCGAGCAGCTC
      E K L V D S M V D V A V P D L G S F P E D L
4885 CACGAGCACATCGGGGTTCGTGCACGAGTGCAGCGGCGAGCTGCACGCGCTGCTGGTTGCCGAGACT 4950
      GTGCTCGTGTAGCCCCAGCACGTGCTCACGCCCGCTCGACGTGCGCGACGACCAACGGCTCTGA
      V L V D P D H V L A A A L Q V R Q Q N G L S
4951 GAGGTCGGCGACGTCGTCGCCGAATCGGGAACCAACACCGAGGCGGTTCGGCCAGCGCCGCGCCGA 5016
      CTCCAGCCGCTGCAGCAGCGCTTAGCCCTTGGTTGTGGCTCCGCCAGCCGGGTTCGCGCGCGGCT
      L D A V D D G F R S G V G L R D A W R R A S
5017 CTCCGCGGCCTCGGCGGTCTCCATCCCATGGAGTCTCGCGAGGAAGGTGAGTTGTTCTCCGACCTT 5082
      GAGGCGCCGGAGCCGCCAGAGGTAGGGTACCTCAGAGCGCTCCTTCCACTCAACAAGAGGCTGGAA
      E A A E A T E M G H L R A L F T L Q E G V K
5083 CATCTTCGGGTACAGGCCGCGTTCCTCGGGCATGTAGCCGATGCGGCGCCGCGAGATCGAGGTCGAT 5148
      GTAGAAGCCCATGTCCGGCGCAAGGAGCCCGTACATCGGCTACGCCGCGGCGTCTAGCTCCAGCTA
      M K P Y L G R E E P M Y G I R R R L D L D I
5149 GACGTCCTCGCCGATCAGCACGCGGCCCCGCTCGGGGGCGAGAACGCCGAGGATGATGCGCATCGT 5214
      CTGCAGGAGCGGCTAGTCTGTCGCCGGGCGCAGCCCCGCTCTTGCGGCTCCTACTACGCGTAGCA
      V D E G I L V R G A D P A L V G L I I R M T
      BglII
5215 GGTCGACTTGCCGCGCGCTTGCTGCCGACGAAGCCGA AGATCT 5258
      CCAGCTGAACGGCCGCGGCAACGACGGCTGCTTCGGCTTCTAGA
      T S K G A G N S G V F G F I <-- ATPase (unvollständig)

```

Abb. 21 Nukleotidsequenz des Inserts von pMF11 und abgeleitete Aminosäuresequenzen

Wesentliche Restriktionsschnittstellen sind markiert. Die aus der Aminosäuresequenzierung bekannten Aminosäuren von FKBP12 sowie die Nucleotidsequenz des Inserts von pMF150 sind fett gedruckt.

Inverted repeats, direkte repeats und Hairpin-Strukturen sind durch Pfeile symbolisiert. Putative Ribosomenbindungsstellen (RBS) sind doppelt unterstrichen. Sequenzen, die Homologien zu Promotorsequenzen (-10 und -35 Region) aufweisen sind einfach unterstrichen.

Zur Identifizierung von putativen Promotorsequenzen diente der Vergleich mit verschiedenen Promotoren aus Actinomyceten [Stroh, 1992; Fernandes *et al.*, 1999], sowie der Abgleich der Sequenzen in der Genomdatenbank von *M. tuberculosis*.

4.4.1 Identifizierung des *fkB* Gens

Bei der Untersuchung des sequenzierten Bereichs von pMF11 konnte im Bereich von nt 1528 bis 1897 ein offener Leserahmen von 369 bp identifiziert werden. Überraschenderweise codiert dieser für ein Protein von 122 Aminosäuren mit einer Masse von nur 12,9 kDa und nicht von 20 kDa wie es das Laufverhalten des gereinigten FKBP vermuten ließ. Das Protein ist mit einem pI von 4,23 stark sauer, was möglicherweise das abweichende Laufverhalten in der SDS-PAGE erklären könnte. Innerhalb dieses Leserahmens wurde der bereits sequenzierte Bereich von pMF150 lokalisiert (nt 1655 bis 1774). Diese Daten ließen darauf schließen, daß es sich bei der ermittelten DNA Sequenz um das Gen für ein FKBP12 aus *M. smegmatis* handelt, es wurde daraufhin *fkBA* genannt.

Der Leserahmen zeigt einen für Actinomyceten typischen G+C-Gehalt von 71%, dieser steigt in der dritten Codonposition auf 90%. 10 bp vor dem GTG Startcodon konnte zudem eine Ribosomenbindungstelle lokalisiert werden. Hypothetische Promotorstrukturen befinden sich im Bereich von nt 1405-1440. Ein Vergleich mit hypothetischen Promotorregionen aller Gene von *M. tuberculosis* ergab 141 Einträge mit maximal 2 veränderten Basen im -10 und -35 Bereich. Unter diesen befanden sich u.a. die konstitutionell exprimierten Gene für die Asn t-RNA, die Acetyl-CoA-Synthase, die ATP-Synthase und das Hsp20.

Eine Datenbankrecherche der abgeleiteten Aminosäuresequenz zeigte sehr hohe Homologien zu FKBP12s aus Actinomyceten. Das Protein weist z.B. zum FKBP12 aus *Corynebacterium glutamicum* 59% identische und 70% ähnliche Aminosäuren auf. Beide Proteine zeigen eine Auffälligkeit in ihrer Aminosäuresequenz, die essentiellen Aminosäuren Glutamin und Glutaminsäure (Pos. 53 und 54 in humanem FKBP12) treten hier an anderer Position auf, vgl. Abb. 22. Zum FKBP12 aus *S. chrysomallus* zeigt sich eine 43% Identität und 55% Ähnlichkeit. Aufgrund der stark konservierten Bereiche der FKBP12s findet man auch 44% Identität und 60% Ähnlichkeit zum humanen FKBP12. Ein weiterer interessanter Aspekt bei der Datenbanksuche ist die Beobachtung einer sehr starken Ähnlichkeit (ca. 50% Identität) zum C-terminalen Bereich der als Pathogenitätsfaktoren beschriebenen MIPs.

Das interessanteste Ergebnis der Datenbankrecherche war jedoch das Fehlen von *fkB* Genen bei Vertretern der langsamwachsenden Mycobakterien wie *M. tuberculosis* und *M. leprae*.

In Abb. 22 ist der Sequenzvergleich der von *fkBA* aus *M. smegmatis* abgeleiteten Aminosäuresequenz mit Sequenzen einiger ausgewählter Vertreter der FKBP-Familie dargestellt. Zusätzlich sind strukturell und funktionell wichtige Aminosäuren markiert.

Abb. 22 Sequenzvergleich von FKBP12 aus *M. smegmatis* mit einigen bekannten FKBP
Dargestellt sind die abgeleitete Aminosäuresequenz von *fkBA* aus *M. smegmatis* (fkmsmeg). Zum Sequenzvergleich dienten FKBP12 aus *Corynebacterium glutamicum* (fkmcorgl, Acc. Nr.: P42458), FKBP12 aus *Streptomyces chrysomallus* (fkstrch, Acc. Nr.: P28725), Humanes FKBP12 (fkhhomos, Acc. Nr.: P20071) und die beiden FKBP Domänen aus FKBP33 aus *Streptomyces chrysomallus* (fk33doI und fk33doII, Acc. Nr.: S46228). Strukturell und funktionell bedeutende Aminosäuren sind mit Sternchen bzw. Rauten (O und E) markiert.

4.4.2 Analyse des 5'-Bereichs von *fkfA*

70 bp stromaufwärts von *fk bA* endet an Position nt 1469 ein offener Leserahmen, der bei nt 144 beginnt und mit einer Gesamtlänge von 1325 bp für ein abgeleitetes Protein von 437 Aminosäuren kodieren könnte. Der Orf weist einen G+C-Gehalt von 64% und in der dritten Codonposition von 91% auf. Im 5'-Bereich des Orfs konnten eine Ribosomenbindungsstelle an Position 136, d.h. 8 bp vor dem GTG Startcodon, sowie konservierte -10 und -35 Promotorstrukturen im Bereich von nt 66 und nt 86 identifiziert werden. Die Promotorstrukturen zeigen starke Ähnlichkeiten zu Promotoren von Genen, die im Primärmetabolismus eine Rolle spielen. Bei der Datenbankrecherche mit 300 bp des 5'-Bereiches aller *M. tuberculosis* Gene mit den hypothetischen Promotorsequenzen ergaben sich 152 Treffer mit maximal einer Fehlpaarung in diesem Bereich. Gene wie *adh* und *rpoB* (β -

Untereinheit der RNA Polymerase) von *M. tuberculosis* wiesen ähnliche Sequenzen in diesem Bereich auf.

Bemerkenswerterweise ergab die Datenbanksuche mit der abgeleiteten Aminosäuresequenz starke Ähnlichkeiten zu einer Citratsynthase aus *C. glutamicum* (Identität 65%, Ähnlichkeit 79%). Das Citratsynthasegen *gltA* in *C. glutamicum* ist, wie auch das in *M. smegmatis*, nur durch 70 bp vom entsprechenden Gen für FKBP12 getrennt [Eikmanns *et al.*, 1994]. Das weist auf die nahe Verwandtschaft der beiden Organismen hin. Ob diese genetischen Konstellation Signifikanz für die biologische Funktion der beiden Enzyme besitzt, bleibt abzuwarten. Homologien wurden auch zu Citratsynthasen aus Mycobakterien (*M. tuberculosis* und *M. leprae*) gefunden. Da in *M. smegmatis* bereits eine Citratsynthase beschrieben wurde [David *et al.*, 1992], bekam der neu identifizierte Leserahmen den Namen *citB*. Die beiden Citratsynthasen aus *M. smegmatis* gehören unterschiedlichen phylogenetischen Gruppen an (Abb. 23).

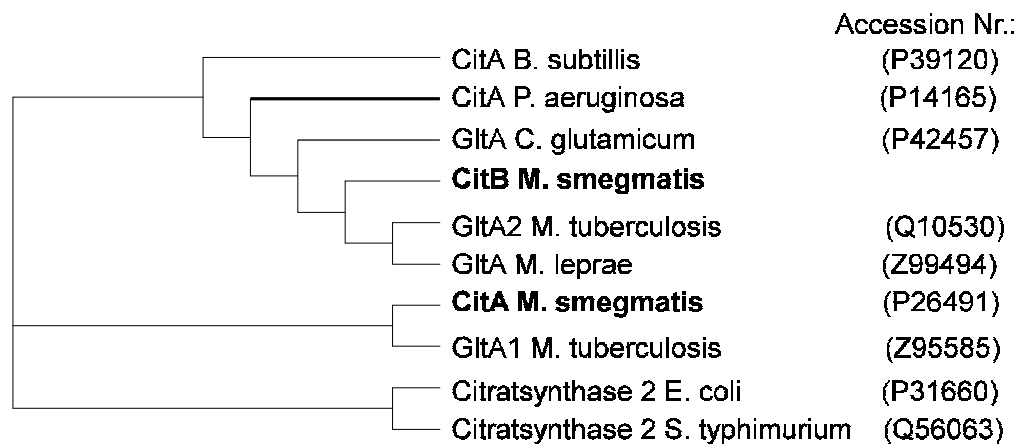


Abb. 23 Phylogenetischer Baum von Citratsynthasen

Innerhalb der phylogenetisch eng verwandten Citratsynthasen aus Actinomyceten, zeigt sich die sehr starke Konservierung der Sequenzen zwischen den einzelnen Vertretern in folgendem Sequenzvergleich.

mscitB	:	M C M L K Q S Q P T R R P T R P Q - R T F T Y P G G K L E L P I L K A T E C T D S V A L G K F L A E T N L T T F D S G F M N T A S T K S A I T Y I D G	:	74
mtcitB	:	-----M A D T D D T - A T L R Y P G G E I D L Q I V H A T E G A D G I A L G P L A K T C H T T F D V G F A N T A A K S S I T Y I D G	:	64
mlcitA	:	-----M A D T D D T - V T L K Y P G G E I D L Q I V R A T E G N D G I A I V P V L A K T G Y T T F D V G Y G N T A S T K S S I T Y I D G	:	64
cgcitA	:	-----M F E R D I V A T D N N K A V L H Y P G G E F E M D I I E A S E G N G V L G K M L S E T G L I T F D P G Y V S T G S T E S K I T Y I D G	:	70
pacitA	:	-----M A D K K A Q L I E G S A P V E L P V L S G T M G P D - V D V R G L T A T G H F T F D P G F M S T A S C E S K I T Y I D G	:	62
mscitB	:	E Q G I L R Y R G I P I E Q L A E K S T F I E V S Y L L I Y G E L P T P T Q L E E F T T K I Q R H T L L H E D L K R F F D G F P R N A H P M P V L S S	:	149
mtcitB	:	D A G I L R Y R G Y P I D Q L A E K S T F I E V C Y L L I Y G E L P D T D Q L A Q F T G R I Q R H T M L H E D L K R F F D G F P R N A H P M P V L S S	:	139
mlcitA	:	D A G I L R Y R G Y P I E Q L A E K S T F I E V C Y L L I Y G E L P A T D Q L A E F T H R I Q R H T M L H E D L K R F Y D G F P R N A H P M P V L S S	:	139
cgcitA	:	D A G I L R Y R G Y D I A D L A E N A T F N E V S Y L L I N G E L P T P D S L H K F N D E I R H T L L D E D F K S Q F N V F P R D A H P M A T L A S	:	145
pacitA	:	D K G V L L H R G Y P I E Q L A E K S D Y L E T C Y L L L N G E L P T A A K E Q E V G T I K N H T M V H E Q L K R F E N G F R R D A H P M A V M C G	:	137
mscitB	:	A V N A L S A Y Y O D S L D P K D D E Q V E L S T I R L L A K L P T I A A Y A Y K K S A G O P F L Y P D N S L S L V E N F L R M T F G F P A E P Y E V	:	224
mtcitB	:	V V N A L S A Y Y O D A L D P M D N G Q V E L S T I R L L A K L P T I A A Y A Y K K S V G O P F L Y P D N S L T L V E N F L R L T F G F P A E P Y Q A	:	214
mlcitA	:	V V N A L S A Y Y O D A L D P M D N G Q V E L S T I R L L A K L P T I A A Y A Y K K S V G O P F L Y P D N A F S L V E N F L R M T F G F P A E P Y E P	:	214
cgcitA	:	S V N I L S Y Y O D Q L N P L D E A Q L D K A T V R L M A K V P M L A A Y A H R A R K G A P Y M Y P D N S L N A R E N F L R M M F G V P T E P Y E I	:	220
pacitA	:	V L G A L S A F Y H D S L D I T N P K H R Q V S A H R L I A K M P T I A A M V Y K Y S K G E P M M Y P R N D L N Y A E N F L H M M F N T B C E T K P I	:	212
mscitB	:	N E D V A K A L D M L F I L H A D H E Q N C S T S T V R L V G S S Q A N L F T S I S G G I N A L W G P L H G G A N Q A V L E M L D A I K A D - G G D T	:	298
mtcitB	:	D P E V V R A L D M L F I L H A D H E Q N C S T S T V R L V G S S R A N L F T S I S G G I N A L W G P L H G G A N Q A V L E M L E G I R D S - G D D V	:	288
mlcitA	:	D P E V V R A L D M L F I L H A D H E Q N C S T S T V R L V G S S R A N L F T S I S G G I N A L W G P L H G G A N Q A V L E M L E G I R E S - G D D V	:	288
cgcitA	:	D P I M V K A L D K L L F I L H A D H E Q N C S T S T V R M I G S A Q A N M E V S I A G G I N A L S G P L H G G A N Q A V L E M L E D I K S N H G G D A	:	295
pacitA	:	S E V L A K A M D R I F I L H A D H E Q N A S T S T V R L A G S S G A N P F A C I A S G I A A L W G P A H G G A N E A V L R M L D E I G D V - S N I	:	285
mscitB	:	K K F M E R V K N K E A G V K L M G F G H R V Y K N Y D P R A A I V K K T A D O I L E T L G V Q D D L L E T A K G L E E V A L N D D Y F I E R K L Y P	:	373
mtcitB	:	S E F V R K V K N R E A G V K L M G F G H R V Y K N Y D P R A A I V K E Q A D K I L A K L G G D S L L G I A K B L E E A A L T D D Y F I E R K L Y P	:	363
mlcitA	:	G G F V Q K V K N Q A G V K L M G F G H R V Y K N Y D P R A A I V K E Q A D K I L V K L G G D D L L N I A K G L E E A A L T D D Y F I E R K L Y P	:	363
cgcitA	:	T E F M N K V K N K E D S V R L M G F G H R V Y K N Y D P R A A I V K E T A H E I L E H L G S - D D L L D L A I K L E E I A L A D D Y F I S R K L Y P	:	369
pacitA	:	D K F V E K A K D K N D P F K L M G F G H R V Y K N F D P R A K V M K Q T C D E V L Q E L G I N D P Q L E L A M K L E E I A R H D P Y F V E R N L Y P	:	360
mscitB	:	N V D F Y T G V I Y R A M G F P T R M F T V L F A L G R L P G W I A H W R E M H E D P T T K I G R P R Q L Y T G Y T E R D Y V P M S D R -	:	441
mtcitB	:	N V D F Y T G L I Y R A L G F P T R M F T V L F A L G R L P G W I A H W R E M H D E G D S K I G R P R Q I Y T G Y T E R D Y V T I D A R -	:	431
mlcitA	:	N V D F Y T G L I Y R A L G F P T R M F T V L F A L G R L P G W I A H W R E M H D E G D S K I G R P R Q I Y T G Y T E R D Y T A I E T R -	:	431
cgcitA	:	N V D F Y T G L I Y R A M G F P T D F F T V L F A I G R L P G W I A H Y R E Q L G A A G N K I N R P R Q V Y T G N E S R K L V P R E E R -	:	437
pacitA	:	N V D F Y S G I L K A I G I P T S M F T V I F A L A T V G W I S H W E M L S - G P Y K I G R P R Q L Y T G H T O R D F A L K D R G	:	428

Abb. 24 Sequenzhomologie zwischen CitB und Citratsynthasen

Dargestellt sind die abgeleitete Aminosäuresequenz von *citB* aus *M. smegmatis* (mscitB) und die Aminosäuresequenzen der Citratsynthasen GltA2 aus *M. tuberculosis* (mtcitB, Acc. Nr.: Q10530), GltA aus *Mycobacterium leprae* (mlcitA, Acc. Nr.: Z99494), GltA aus *Corynebacterium glutamicum* (cgcitA, Acc. Nr.: P42457) und GltA1 aus *Pseudomonas aeruginosa* (pacitA, Acc. Nr.: P14165).

4.4.3 Identifizierung des Gens einer hypothetischen DNA Photolyase im 3'-Bereich von *fkba*

15 bp stromabwärts von *fkba* wurde ein weiterer 1296 bp langer offener Leserahmen gefunden. Dieser Leserahmen besitzt einen typischen G+C-Gehalt von 69%, der in der dritten Codonposition auf 88% ansteigt.

Die einzig mögliche Ribosomenbindungsstelle liegt 15 bp vor dem GTG-Starcodon.

Der Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenz des Orfs mit Proteinsequenzen aus den Datenbanken ergab signifikante Ähnlichkeiten zu DNA-Photolyasen der Folat- und Deazaflavinfamilie (s. Abb. 25). Diese Enzyme besitzen 2 Cofaktoren, zum einen reduziertes FAD und zum anderen 5,10-Methylentetrahydrofolsäure (MTHF) oder 7,8-didemethyl-8-hydroxy-5-Deazariboflavin (8-HDF). Diese Cofaktoren bilden eine Art Lichtsammelkomplex. Die Enzyme sind dadurch in der Lage, durch Elektronentransfer Thymindimere zu spalten. Dadurch werden UV induzierte DNA-Schäden repariert [Kim and Sancar, 1993].

msphr1	:	-----MWLRRDLRLGDLPAQAARGTDDSSVLLCFVVDPRRLARS--SGERRLAFFDSRELDLDDKL---DGRLLV	:	65
ttphr1	:	MGPLLWVHRRGDLRLHDPALLEALARGP--VVGILVVDPPNNLKT--TPRRRAWFLENVRALREAYRRAGGALWV	:	70
sgphr1	:	MSVAVVLFSTDLRLHDPVRAALRDAD-EVVPFVVRDDAVHRAAGFDAPNPLAFTADCAALDAGLRHRGGRLIV	:	74
ecphr1	:	MTTHLVWFRQDLRLHDLNLAALAAACRNSSARVLAITYATPRQWATHNMSPRQAELNAQNLQIALAEKGIPLLE	:	75
ssphr1	:	AAPILFWHRRDLRLSDNIGLAAARAQSA-QLIGLFCFLDPQILQSADMAPARVAYLQGCLOELQQRYYQQACSRLLL	:	74
msphr1	:	MRGR---PDEETPRRLARAVDAEAVHISADFTEFGRRRDEAVAEALGEVPL-EATGSPYLVLS---PGRITKDDG-	:	131
ttphr1	:	LEGL---PWEKVPEAARRLKAKAVYALTSYTPYGRVYRDAKVOEATP-VPL-HILPAPHLLP-----P-DLP-	:	130
sgphr1	:	RRGE---AATEVRRVAEETGAARVHIAAGVSRVYARREQREREALADSGR-ELHVHDAVVTALAEGRVVP TGK	:	144
ecphr1	:	REVDDFVASVEIVKQVCAENSVTHLFYNYQYEVNERARDVVERALRNVC-EGFDDSVILP---PGAVMTGNH-	:	145
ssphr1	:	LQGD---PQHLIPQLAQQLQAEAVYWNQDIEFYGRDRDQGVAAAKTKTAGIRAVQLWDQILHS--PDOLLSGSG-	:	142
		##		
msphr1	:	EPYKVFTEPFERRWRDHGWR---RPAESSVPSSAVVDPADIANSGRIAVPTAPVKLSFP-----AGEDAARQWR	:	196
ttphr1	:	RAYRVYTPFARRFLGVEAP---LPAPEALPKGPEEGE--TER---EDPG---LPLPE-----PGEBAALAGL	:	186
sgphr1	:	DHFAVFTPYFRRWEAEGVRGTQTAPRTVRVPDGVASDF--LSD--RDCVENLSPGLAR-----GGEBAARGLV	:	208
ecphr1	:	EMYKVFTEPFKNALWLRREGMPECVAAAPKVRSSGSIEF--SPSITLNYPRQSFDTAHFP-----VEKKAATLQL	:	212
ssphr1	:	NFYSVYGFPRNNWQAQPKP-TPVATPTTELVDLSPEQLTAIALLLSELPTLKQLGFDWDGGFFVPEPGETAAIARL	:	216
msphr1	:	AEFVDADLADYDEIRDDPAADATSRMSAYLKYNTHPR-----TLAVDLG---KG-KGAQAVLRELAFRDFYAD	:	261
ttphr1	:	RAFLEAKFPAAEERDRLDGEGRSLSPYFALGVLSPR-----LAAWEAER--RGEGARKWVAELWRDFSYH	:	253
sgphr1	:	TSWLNQPMADVEDGHDDLAGDATSRSLPHLHFGTVSAA-----ELVHRARE--KGGLGGEAFVROLAWRDFHHQ	:	275
ecphr1	:	RQFCQNGAGEYEQQRDFPAVEGTSRLSASLATGGLSPRQ--CLHRLLAEQPQALDS-GAGSNWLNELWREFYRH	:	284
ssphr1	:	QEFCDRAIADYDPORNFPAEAGTSGLSALKFGAIGTRQAWQAASAAHALSRSDSEARNISRVWQELAWREFYQH	:	291
		* **** *		
msphr1	:	VLWHWVHSLWH-NWNNRRFDAIELDTPDAAYERFEVWKACRTGFPLVDAGMRQLNETGWMHNRVRMITASFVLKDL	:	335
ttphr1	:	LLYHFPWMAER-PLDPRFQALPWQDE---ALFRAWYEGRTGVPLVDAAMRELHATGFLSNRRARMNAQFAVKHL	:	324
sgphr1	:	VLAADRPDASWS-DVRRPRHWRWRSAD---E-MHAWKSGLTGYPLVDAAMROLAHEGWMHNRARMNAASFLLTKTL	:	344
ecphr1	:	LITYHPSLCKHRPFAWTDRVQWQSNP---AHLQAWDECKTGYPVDAAMROLNSTGWMHNRRLMITASFVLKDL	:	356
ssphr1	:	ALYHFPSLADG-PRSLWQQFPWENRE---ALFTAWTQAQTGYPIVDAAMROLTETGWMHNRCRMIVASFLLTKDL	:	362
		## * *		
msphr1	:	HLPWWWGAE-YFLEQLVDGDMASNNHGWQWAACTGTDAAPYFRVFNFPQTQAKKFDPKGEYVRRV--GDVEAD--	:	405
ttphr1	:	LPLWKRCCE-AFRHLLLDGDRAVNLQGWQWAGLGVDAAPYFRVFNFPVQLGERHDPGRWLKRAP--EYPSYAP	:	396
sgphr1	:	YVDWRREGAR-HFLDLDLDGDVANLNQWQWVAGTGTDRPNRVLNFPVIQGRFDARGDYVRGWVPELAEVEGSAI	:	418
ecphr1	:	LIDWREG-ERYFMSOLIDGLAANNNGWQWAACTGTDAAPYFRIFNETTQGEKFDHEGEFIRQWLPELRDVPKGV	:	430
ssphr1	:	LIDWREG-EQFEMQHLVDGLAANNNGWQWASASGMDPKPLRIFNPASQAKKFDATATYIKRWLPFLRHVHPKDL	:	436
		# * **		

Abb. 25 Sequenzhomologie zwischen PHR1 und DNA-Photolyasen

Dargestellt sind die abgeleitete Aminosäuresequenz von *phrA* aus *M. smegmatis* (msphr1), sowie Photolyasen aus *Thermus thermophilus* (ttphr1, Acc. Nr.: BAA22943), *Streptomyces griseus* (sgphr1, Acc. Nr.: P12768), *Escherichia coli* (ecphr1, Acc. Nr.: P00914) und *Synechococcus sp.* (ssphr1, Acc. Nr.: P05327). Die Cofaktorbindungsstellen sind für Phr1 aus *E. coli* mit Sternchen (FAD) und mit Rauten (MTHF) markiert.

Eine Promotorstruktur, die von alternativen ECF-Sigmafaktoren [Fernandes *et al.*, 1999] erkannt werden könnte, wäre im Bereich von nt 1752 bis nt 1786 möglich. Der -10 Bereich wäre hierbei Teil einer palindromischen Sequenz, was möglicherweise auf die Bindung eines Repressors hinweist. Bei einem Vergleich dieser Sequenzen mit putativen Promotoren aller Gene von *M. tuberculosis* ergaben sich mit maximal einer Base Abweichung im -10 und -35 Bereich signifikante Ähnlichkeiten zu Promotoren der UV induzierbaren Gene *recR* und *uvrA*. Beide Genprodukte sind ebenfalls an DNA Reparatursystemen beteiligt. RecR katalysiert einen Schritt der RecBC unabhängigen DNA Reparatur und UvrA ist an der UV induzierten Excisionsreparatur beteiligt.

Wie in Abb. 25 zu erkennen ist, sind DNA-Photolyasen in ihrem C-terminalen Ende sehr stark konserviert. In diesem Bereich befinden sich die allen DNA-Photolyasen gemeinsamen DNA-Bindungsdomänen und die Bindungsstellen für FAD. Der variabelere N-terminale Bereich enthält als konservierte Bereiche nur die Bindungsstellen für den zweiten Cofaktor.

Es ist aus Untersuchungen an *M. tuberculosis* und aus der Sequenzierung des gesamten Genoms von *M. tuberculosis* und *M. leprae* bekannt, daß diese Organismen kein System zur DNA Photoreparatur besitzen [Mizrahi and Andersen, 1998]. Nach der Identifizierung des *phrA* genannten Orfs in *M. smegmatis* wurde beschlossen zu prüfen, ob *M. smegmatis* ein solches DNA-Photoreparatursystem besitzt und wie dieses reguliert wird (siehe 4.6).

4.4.4 Untersuchung weiterer kodierender Bereiche von pMF11

Die weitere Analyse der DNA-Sequenz von pMF11 im 3'-Bereich von *phrA* ergab zwei weitere offene Leserahmen in entgegengesetzter Richtung. Der erste ORF (nt 4456 bis nt 3257) zeigt in seiner abgeleiteten Aminosäuresequenz 23% Identität und 42% Ähnlichkeit zu *natB* aus *Bacillus firmus*. Dieses Protein ist als Membrankomponente des Natrium-ABC-Transportsystems in *B. firmus* und *B. subtilis* beschrieben worden [Wei *et al.*, unveröffentlicht; Cheng *et al.*, 1997]. Aus diesem Grunde wurde der hier aufgefundene ORF *natB* genannt. Weitere Homologie findet sich nur für ein weiteres *natB* homologes hypothetisches Protein. Ein Sequenzvergleich dieser verschiedenen Proteine zeigt die höchste Übereinstimmung sowohl in einigen membranspannenden Helices, als auch in zwei cytosolischen oder extrazellulären Domänen dieser Proteine (siehe Abb. 26)

Ein Indiz für das Vorliegen eines Genclusters, welches für ein ABC-Transportsystem kodiert, ist die Sequenzhomologie des stromaufwärts von *natB* gelegenen Orfs. Dieser Orf liegt nicht mehr in ganzer Länge auf pMF11 (nt 5258 bis nt 4456). Die abgeleitete Aminosäuresequenz, des *natA* genannten Orfs, zeigt die höchste Ähnlichkeit zu den ATPasen NatA aus *B. firmus*, sowie zu hypothetischen ATPasen der beiden bereits erwähnten Nat-homologen ABC-Transporter. Aus dem Vergleich geht hervor, daß die Sequenz von pMF11 etwa 80 bp vor dem Stopcodon von *natA* endet.

msnatb	:	MTVLHDP	TTQNPPA	GAAQA	IRLVAE	REIT	TRVR	TKS	FLVST	GLLMVLLI	AGAI	VLRI	FAGG	DSA----	EKIAV	:	70																																																											
bfnatb	:	-----	MR-----	NFG	ILIAHT	YKNR	-----	MSK	AFLIST	TVIT	LAFLM	VMTN	MDRI	EFEM	FEED	DAESRAVE	AV	:	58																																																									
bsyahp	:	-----	MN-----	KFW	IMLSHT	YKNN	-----	LMAS	PIIST	VITV	VLLVLV	VVTN	ES	IS	LFQGD	----	DAKEIAV	:	56																																																									
mj1024	:	-----	MNSGD	IMKLN	IKKILT	IGKRE	VLNS	KRKQ	FLIATI	IGP	LIITAI	AILG	SFEM	MF	DIK	----	EIKVGY	:	63																																																									
msnatb	:	VA	Q	P	Q	S	V	T	D	S	I	V	A	V	A	D	S	A	G	T	--	LD	V	E	P	A	S	S	V	D	-	E	A	R	L	V	S	D	G	V	A	L	V	P	G	-	H	T	A	G	S	-	Y	V	I	L	G	K	D	G	F	D	P	-	A	V	E	G	:	139						
bfnatb	:	VE	G	S	E	L	Y	E	P	L	N	E	Q	L	M	Q	H	E	D	R	--	LO	L	T	R	T	S	L	S	E	E	A	L	A	V	S	S	G	E	F	G	A	V	L	V	N	R	D	S	A	C	D	I	Q	A	T	Y	S	D	S	L	T	Q	Q	F	T	P	I	:	131						
bsyahp	:	V	D	E	T	N	E	L	P	V	P	F	S	K	Q	L	K	A	V	D	T	D	G	D	V	V	K	L	S	K	S	S	D	E	V	T	Q	V	K	D	E	S	L	D	C	M	L	I	K	R	D	E	K	C	T	I	S	G	T	Y	K	A	L	T	I	S	D	E	S	T	Y	Q	:	131		
mj1024	:	V	D	E	F	G	L	G	I	P	N	K	V	V	E	N	N	F	G	K	N	T	-	T	Y	F	I	K	Y	E	N	I	E	-	K	G	K	E	D	V	L	K	S	I	D	A	L	I	V	I	P	K	D	V	L	D	S	G	K	I	I	L	Y	S	T	P	K	S	----	P	N	:	132			

msnatb	:	P	R	T	A	V	S	Q	E	A	L	S	R	A	L	A	D	R	G	V	D	A	A	S	T	P	A	V	D	V	T	V	S	I	D	P	A	R	P	D	E	G	----	O	R	I	V	A	M	V	G	F	V	L	L	M	A	I	T	M	G	G	T	M	V	A	:	207								
bfnatb	:	Q	L	Q	N	A	L	Q	H	I	K	E	E	A	T	Q	E	L	G	S	G	E	V	I	A	D	I	S	P	I	F	E	T	S	T	V	S	D	T	A	R	T	S	E	L	N	Q	A	R	S	V	V	V	L	E	V	I	F	S	V	L	I	F	G	N	M	I	A	:	206						
bsyahp	:	T	L	Q	A	L	T	Q	T	K	T	A	V	G	T	A	E	L	G	V	S	Q	E	T	S	S	L	Y	A	P	V	T	V	G	Q	K	A	L	K	E	G	A	K	S	S	E	L	G	T	V	G	L	V	Y	L	M	F	V	I	F	S	V	L	I	M	Y	A	S	M	I	A	:	206			
mj1024	:	P	R	T	D	T	L	N	K	F	L	K	K	L	K	G	K	V	D	N	K	T	N	R	V	I	N	P	M	N	L	E	I	Y	S	V	S	K	G	-	F	E	R	E	T	F	L	S	Q	L	P	I	G	F	V	F	L	L	M	A	I	S	L	S	G	L	I	V	:	206						

msnatb	:	V	G	V	E	E	K	S	R	V	E	L	L	A	T	I	K	P	H	L	M	G	K	V	I	G	I	A	V	L	T	O	V	V	----	G	A	T	A	V	T	A	G	----	H	A	T	G	I	T	V	P	G	A	A	V	:	271																		
bfnatb	:	T	E	A	T	E	K	S	R	V	E	L	L	S	A	S	D	V	A	Q	M	F	G	K	I	V	G	I	G	L	A	L	T	O	V	G	I	F	L	V	I	L	S	S	A	G	A	E	Q	A	E	G	G	L	S	M	L	Q	A	E	S	E	D	P	L	:	281									
bsyahp	:	M	E	V	A	T	E	K	S	R	V	E	L	L	S	M	P	I	Q	M	F	A	K	L	L	G	I	G	L	V	G	I	T	O	L	A	I	I	G	A	S	L	S	-	L	K	L	N	Q	K	S	E	T	A	S	V	G	A	F	N	L	T	V	S	A	:	280									
mj1024	:	S	S	I	E	E	K	Q	N	R	I	M	E	L	L	C	Y	S	S	A	E	N	L	M	F	G	K	I	L	G	I	S	A	V	G	L	Q	I	G	----	L	W	V	L	F	A	L	P	I	----	H	----	T	Y	A	V	K	V	S	L	:	266														

msnatb	:	S	M	F	A	A	S	L	A	W	F	V	L	G	L	F	P	A	S	L	V	A	S	C	A	I	V	S	R	O	E	E	S	S	A	P	L	T	V	L	S	L	A	V	L	S	G	I	F	G	V	Q	A	L	D	S	T	I	E	T	L	S	W	I	P	P	S	A	:	346						
bfnatb	:	D	L	I	G	F	A	V	L	F	F	V	L	G	Y	L	E	Y	A	T	L	A	A	T	L	G	S	L	V	S	R	I	E	D	V	N	Q	V	I	G	P	M	N	L	L	V	I	V	A	F	F	I	A	M	E	G	L	N	A	P	E	S	S	T	V	T	S	F	I	P	F	F	S	P	:	356
bsyahp	:	T	T	V	I	Y	A	V	I	F	F	L	L	A	Y	F	S	A	T	L	A	A	F	L	G	S	V	S	R	I	E	D	V	Q	T	T	P	M	L	L	V	V	A	G	F	M	I	A	M	E	G	L	N	A	P	D	A	G	E	T	V	T	S	F	I	P	F	F	T	P	:	355				
mj1024	:	Y	E	A	I	F	A	L	I	Y	F	V	L	G	Y	L	F	Y	S	S	L	C	G	L	S	S	L	F	S	H	P	K	D	A	S	Q	L	S	P	I	I	I	Q	I	P	I	M	F	M	N	T	I	M	V	N	P	N	H	Y	M	A	K	L	S	Y	V	P	F	T	A	P	:	341			

msnatb	:	A	L	M	P	I	R	I	A	T	L	G	D	T	D	V	E	Q	I	V	----	V	T	-	F	L	L	W	H	W	H	G	R	D	L	D	D	R	A	D	L	P	A	I	N	P	A	H	R	I	A	H	E	L	G	----	:	399																		
bfnatb	:	M	I	M	F	L	R	V	G	M	L	S	I	P	L	W	E	L	L	S	I	G	L	L	A	S	I	G	L	L	A	T	I	G	A	R	I	F	K	G	V	L	L	Y	G	K	S	S	A	L	K	D	I	G	R	A	L	R	M	T	R	K	:	420												
bsyahp	:	M	I	M	V	L	R	V	G	M	L	D	I	P	F	W	Q	A	A	V	G	I	G	I	T	L	L	T	I	V	L	A	V	I	G	A	R	I	Y	K	G	V	L	I	Y	G	N	S	S	A	F	K	A	L	Q	A	L	R	L	A	K	N	:	419												
mj1024	:	Y	A	V	V	L	R	S	V	T	Q	L	P	L	I	E	I	V	L	S	T	A	M	I	V	S	I	V	S	I	S	F	L	S	I	K	L	F	K	I	G	V	L	L	Y	E	E	N	L	T	L	K	R	V	I	K	-	:	403																	

Abb. 26 Sequenzvergleich von NatB zu Membranproteinen aus ABC-Transportern

Dargestellt sind die abgeleitete Aminosäuresequenz von *natB* aus *M. smegmatis* (natBms). Die einzigen homologen Proteine sind NatB aus *Bacillus firmus* (natBbf, Acc. Nr.: AF084104), Yahp aus *Bacillus subtilis* (Acc. Nr. Y14078) und MJ1027 aus *Methanococcus janaschii* (Acc. Nr. Q58430). Die fünf Membranhelices sind durch schwarze Balken markiert.

Interessanterweise ist das Nat-System aus *Bacillus subtilis* ein nur durch zwei Gene kodiertes ABC-Transportsystem, dessen Expression durch Streß induziert wird [Cheng *et al.*, 1997]. Erst mit geringer Konservierung folgen ATPasen aus *M. tuberculosis* und *M. leprae*, die aber von ihrer genetischen Organisation nicht Teile von Nat-homologen ABC-Transportern sein können. Für einen funktionellen Zusammenhang der beiden Orfs spricht auch das Auftreten eines gekoppelten Start/Stopcodons zwischen beiden, was möglicherweise auf eine polycistronische Transkription und damit auf eine gemeinsame Regulation hindeutet. Da sich der ORF für die hypothetische ATPase jedoch nicht mehr vollständig auf pMF11 befindet, konnte am hypothetischen Natrium-ABC-Transporter von *M. smegmatis* nicht weiter gearbeitet werden.

4.5 Molekularbiologische und proteinchemische Charakterisierung von FKBP12 aus *M. smegmatis*

4.5.1 Heterologe Expression von *fkbA* und Charakterisierung des Genprodukts

Zur enzymatischen Charakterisierung von FKBP12 aus *M. smegmatis* sollte das Gen in *E. coli* heterolog exprimiert werden. Dazu wurde das pQE-System (Qiagen) verwendet. Bei der Verwendung des Vektors pQE32 wird das Gen unter die Kontrolle des *lacZ* Promotors gebracht. Zusätzlich enthält der Vektor die Nucleotidsequenz zur Fusion des Genproduktes mit 6 N-terminalen Histidinen. Durch diese Modifikation lassen sich Proteine effektiv über eine Nickelchelatomatrix reinigen.

Zur Generierung der für die „in Frame“ Klonierung nötigen Restriktionschnittstellen wurde eine PCR mit folgenden Primern durchgeführt:

smegFK12f 5'-CAAAGGAGAGGTACCGTGACCAGCACC-3'
smegFK12r 5'-CCTGAGCCACACAAGCTTGGTGGCC-3'

Die PCR wurde mit diesen Primern und pMF11 als Template unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Denaturierung:	1,0 min 95°C	
Annealing:	1,5 min 54°C	
Polymerisation:	1,0 min 72°C	35x

Das amplifizierte 409 bp Fragment enthält das *fkbA* Gen mit dem natürlichen Stopcodon und wird durch eine *KpnI* und eine *HindIII* Schnittstelle flankiert.

Nach der Extraktion des Fragments aus einem Agarosegel wurde es mit *KpnI* und *HindIII* behandelt und zunächst in pTZ18U *KpnI/HindIII* kloniert und in *E. coli* DH5 α transformiert. Das so erhaltene Plasmid pMFFK12/3 wurde zur Kontrolle sequenziert.

Nachfolgend wurde das Fragment aus pMFFK12/3 erneut mit *KpnI/HindIII* ausgeschnitten und in pQE32 *KpnI/HindIII* kloniert. Zur Konstruktion des Expressionsplasmids wurde zunächst in *E. coli* JM109 transformiert und das entstandene Plasmid pQEFK12/3 durch Restriktionsanalyse auf seine Richtigkeit überprüft. Nachfolgend wurde das Plasmid in *E. coli* M15 transformiert.

Es wurden 4 x 400 ml (2YT, Amp₁₀₀, Kan₂₅) mit je 5 ml einer 50 ml Vorkultur (2YT, Amp₁₀₀, Kan₂₅) angeimpft und bei 37°C geschüttelt. Bei einer OD₆₀₀ von 0,6 wurde mit 1 mM IPTG induziert und für weitere 4 Stunden bei 37°C inkubiert.

Die Zellen wurden abzentrifugiert (20 min, 10.000 rpm, 4°C) und in Ni-NTA Auftragspuffer resuspendiert (4 ml je g Zellen). Der erste Schritt zur Reinigung von His6-FKBP12 war eine Ni-Chelatchromatographie. Das bei 250 mM Imidazol eluierte Protein (vgl. 3.11.3) wurde

gegen 2 x 2 l 50 mM TRIS pH 8,0 dialysiert und im zweiten Schritt einer Anionenaustauschchromatographie an DEAE-Zellulose unterzogen. Die PPIase-Aktivität eluierte wie das native Enzym bei etwa 150 mM NaCl. Die in einer Amicon Zelle mit PM10 Membran aufkonzentrierten Proteine wurden auf einer SephadexTM75 Gelfiltrationssäule getrennt (100 mM NaCl, 50 mM TRIS pH 8.0).

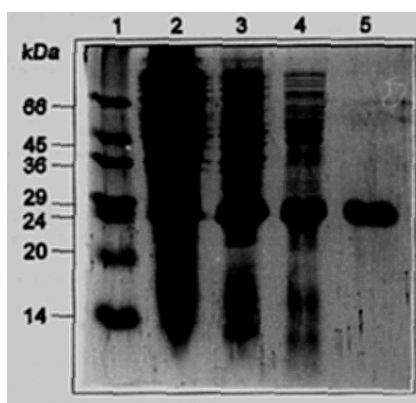


Abb. 27 Reinigung von His6-FKBP12

15%iges PAA-Gel nach Coomassie Färbung

Aufgetragen sind: 1 Molekulargewichtsstandard, 2 *E. coli* Rohextrakt, 3 Ni-NTA-Pool, 4 DEAE-Pool, 5 gereinigte His6-FKBP12 nach Gelfiltration

Wie in Abb. 27 zu erkennen ist, konnte das rekombinante Protein zur annähernden Homogenität gereinigt werden. Nachfolgende Tabelle stellt die Effizienz der Reinigung von His6-FKBP12 dar.

Reinigungsschritt	Volumen (ml)	Protein (mg)	Units ^a (BE)	spezifische Akt. (BE/mg)	Reinigungsfaktor	Ausbeute (%)
Zellextrakt	30	750	12,5x10 ⁵	1674	1	100
Ni-Chelat chromatographie	10	32	7,9x10 ⁵	24615	14,7	63,5
DEAE-Cellulose	15	22	5,9x10 ⁵	26800	16	47,3
Superdex TM 75	6	8,2	3,1x10 ⁵	37500	22	24,6

^a BE=($k_{\text{obs}}/k_{\text{un}}$)-1

Tabelle 8: Reinigung von rekombinantem His6-FKBP12 exprimiert in *E. coli*

Die Proteinbestimmung der Proteinpools erfolgte nach Bradford, für das gereinigte Enzym wurde die Konzentration photometrisch bestimmt. Die Messung der PPIase-Aktivität wurde im Chymotrypsin gekoppelten Test mit Suc-Ala-Leu-Pro-Phe-pNA bei 10°C durchgeführt.

Beim letzten Reinigungsschritt war ein Verlust der Ausbeute um ca. 50% zu beobachten, gleichzeitig stieg die spezifische Aktivität nur noch geringfügig an. Dieser Umstand ist auf die Ausbildung von inaktiven Dimeren und Tetrameren in vorgereinigten und aufkonzentrierten

Proteinproben zurückzuführen. Das Monomer zeigt jedoch dieselbe spezifische Aktivität wie das Wildtyp Enzym.

Da weder im Elutionsverhalten von FKBP12 und His6-FKBP12 bei den beschriebenen Reinigungsschritten, noch in der spezifischen Aktivität, Unterschiede erkennbar waren, wurde das gereinigte His6-FKBP12 benutzt, um die enzymatischen Eigenschaften des mycobakteriellen FKBP's zu bestimmen.

Die Substratspezifität ist in Tabelle 8 im Vergleich zu FKBP12 aus *S. chrysomallus* gezeigt.

Substrat Suc-ALA-XAA-PRO-PHE-pNA	k_{cat}/K_M <i>M. smegmatis</i>	k_{cat}/K_M <i>S. chrysomallus</i>
LEU	2326	2400
PHE	1555	2500
HIS	1111	500
TRP	594	n.b.
LYS	403	110
ALA	390	150
GLN	286	n.b.
GLU	129	30
VAL	125	n.b.
GLY	1,6	0,7

Tabelle 9: Substratspezifität von His6-FKBP12 verglichen mit der des FKBP12 aus *S. chrysomallus*

Die enzymatischen Messungen wurden mit dem entsprechend Abb. 27 gereinigtem His6-FKBP12 durchgeführt. Die Messung der PPIase-Aktivität wurde im Chymotrypsin gekoppelten Test bei 10°C durchgeführt. Hierbei kamen Proteinkonzentrationen von 20 nM bis 20 µM zum Einsatz. Die Daten für das *S. chrysomallus* Enzym entstammen Pahl and Keller [1994].

Beim Vergleich der Substratspezifität der beiden aus Actinomyceten isolierten und charakterisierten cytosolischen 12 kDa FKBP's zeigen sich keine signifikanten Aktivitätsunterschiede, was möglicherweise auf gleiche intrazelluläre Zielstrukturen hindeuten könnte.

Auch bei der Inhibierung von His6-FKBP12 mit Rapamycin und FK506 zeigen sich keine Unterschiede zu bekannten FKBP's. Für Rapamycin kann aus Abb. 28 eine Inhibitorkonstante (IC_{50}) von 5 nM und für FK506 von 24 nM abgeleitet werden.

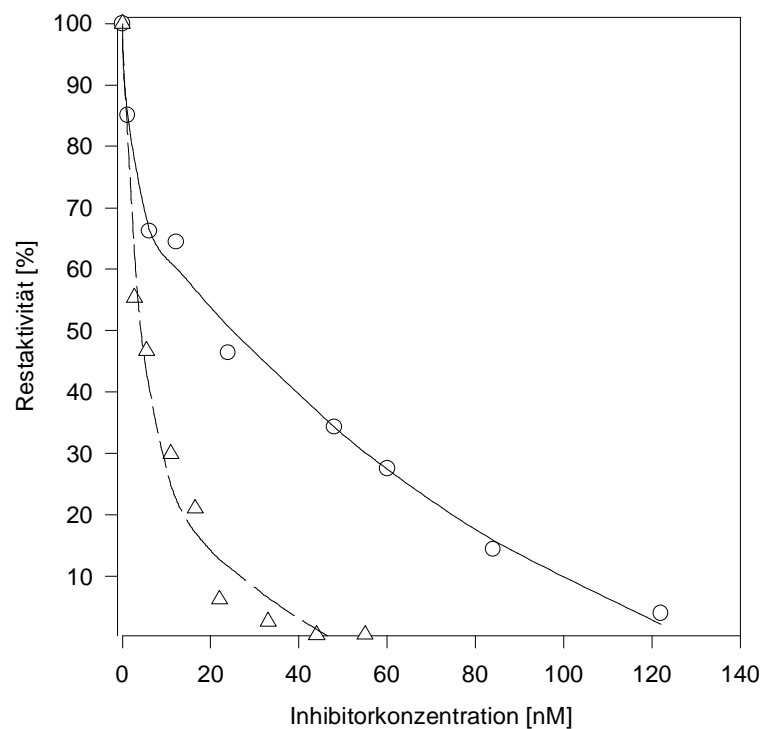


Abb. 28 Inhibierung der PPIase-Aktivität von His6-FKBP12 durch Rapamycin und FK506

Dargestellt ist die Inhibierung mit Rapamycin --- Δ ---, und FK506 — \circ —.

Das gereinigte His6-FKBP12 wurde in einer Konzentration von 20 nM eingesetzt. Vor der Messung wurde es mit unterschiedlichen Mengen FK506 oder Rapamycin für 10 min auf Eis vorinkubiert. Die Messung erfolgte mit Suc-Ala-Leu-Pro-Phe-pNA im Chymotrypsin gekoppelten Test bei 10°C.

Die Homologien der Aminosäuresequenz, die enzymatische Aktivität und die Inhibierungskinetik charakterisieren FKBP12 aus *M. smegmatis* klar als Vertreter von cytosolischen prokaryontischen FKBP. Welche zellulären Funktionen das Protein in schnellwachsenden Mycobakterien besitzt und wie das Fehlen dieser Proteinfamilie in langsamwachsenden Mycobakterien zu erklären ist, bleibt Gegenstand weiterer Untersuchungen.

4.5.2 Transkriptionelle Analyse von *fkba*

Einen wesentlichen Bestandteil zur Untersuchung möglicher spezifischer zellulärer Funktionen von FKBP12 stellt die Regulation der Genexpression dar. Hierzu wurde die Transkription von *fkba* zu verschiedenen Zeiten untersucht. Die gesamte RNA wurde hierfür aus Flüssigkulturen zu verschiedenen Wachstumsphasen isoliert. Als radioaktive Sonde diente bei diesen Untersuchungen das bereits beschriebene durch PCR amplifizierte *fkba* Gen (siehe 4.5).

Da nach der Sequenzierung von pMF11 weder im 5'- noch im 3'-Bereich von *fkbA* eindeutige Terminationssequenzen zu finden waren, diente der Northern Blot auch der Bestimmung der Transkriptgröße und der Identifizierung möglicher cotranskribierter Gene. Als solche kämen nur die Citratsynthase (*citB*) sowie die hypothetische Photolyase (*phrA*) in Betracht.

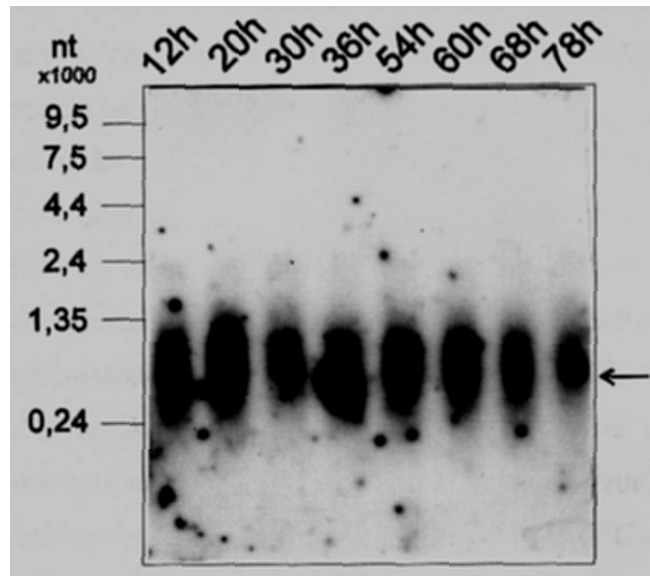


Abb. 29 Northern Blot an gesamt RNA aus *M. smegmatis* zum Nachweis der *fkbA* mRNA

Gesamt RNA von *M. smegmatis* wurde zu unterschiedlichen Wachstumsphasen des Organismus aus HMG Flüssigkulturen isoliert. Ca. 50 µg RNA wurden im 1%igen Formaldehyd/Agarosegel getrennt. Zur Hybridisierung wurde das radioaktiv markierte Fragment aus pMFFK12/3 eingesetzt. Die mRNA von *fkbA* im Größenbereich von ca 500 nt ist mit einem Pfeil markiert.

Wie aus Abb. 29 ersichtlich, ist die *fkbA* mRNA als ein ca. 400 nt großes Transkript im Northern Blot nachzuweisen. Im Verlauf der Kultivierung von *M. smegmatis* in Flüssigkultur ist keine Änderung der Intensität und Größe dieses Transkripts festzustellen. Neben der mRNA für *fkbA* treten keine weiteren Hybridisierungssignale auf. Das *fkbA* Gen liegt somit trotz fehlender Terminatorsequenzen auf einer monocistronischen mRNA vor. Die Transkription von *fkbA* erfolgt sehr wahrscheinlich unter der Kontrolle eines konstitutiven Promotors. Elemente eines solchen Promotors wurden in der 5'-Region von *fkbA* lokalisiert (siehe Abb. 21). Das könnte wie im Falle des analogen Gens aus *S. chrysomallus* auf eine generelle, möglicherweise essentielle Funktion der FKBP in Actinomyceten hinweisen (vgl. auch 4.1.1).

4.6 Charakterisierung von *phrA* und Untersuchung der DNA-Photoreparatur in Actinomyceten

Es ist bekannt, daß *M. tuberculosis* und *M. leprae* kein DNA-Photoreparatursystem besitzen [Mizrahi and Andersen, 1998]. Da jedoch im Rahmen der Sequenzierung von pMF11, im unmittelbaren 3'-Bereich von *fkbA*, ein offener Leserahmen identifiziert werden konnte, der möglicherweise für ein solches System kodiert, mußte die DNA-Photoreparatur in *M. smegmatis* näher untersucht werden.

DNA-Photolyasen sind in der Lage Thymindimere (siehe Abb. 30), wie sie z.B. durch UV-Strahlung (200-400 nm) oder oxidativen Stress in der DNA entstehen, aufzulösen. Dazu nutzen sie die Energie von nahem UV- und sichtbarem Licht (300-500 nm). Neben den ubiquitären Reparatursystemen wie Excisionsreparatur und SOS-Reparatur stellen DNA-Photolyasen einen hochspezialisierten Schutzmechanismus vor DNA-Schäden dar. DNA-Photolyasen arbeiten bei der Auflösung der Thymindimere fehlerfrei, d.h. bei der Reparatur entstehen keine Punktmutationen. Organismen mit der Fähigkeit zur Photoreparatur haben daher eine größere Toleranz gegenüber DNA-Schädigungen durch UV-Licht und oxidativen Streß [Kim and Sancar, 1993].

DNA-Photolyasen sind aus verschiedenen Organismen beschrieben worden. Dabei zeigt sich gerade bei Mikroorganismen eine sehr artspezifische Ausstattung mit dieser Art von Reparatursystemen. So enthalten beispielsweise *Streptomyces griseus* und *S. lividans* Photoreparaturmechanismen, während sie in *S. coelicolor* fehlen [Hopwood *et al.*, 1984; Kobayashi *et al.*, 1989].

Bisher sind vier Familien von Photolyasen bekannt. Die pflanzlichen „blue Light“ Rezeptoren, die (6-4)-Photolyase und zwei Klassen, die Thymindimere spalten [Kanai *et al.*, 1997]. Die beiden letzten Klassen enthalten reduziertes FAD als ersten Cofaktor und 5,10-Methyltetrahydrofolat (MTHF) oder 7,8-didemethyl-8-hydroxy-5-Deazariboflavin (8-HDF) als zweites Chromophor. Der zweite Cofaktor definiert die Zugehörigkeit zur Deazaflavin- oder zur Folatklasse der Photolyasen. Die unterschiedlichen Cofaktoren bestimmen auch das Aktionsspektrum der Photolyasen in Bezug auf das von ihnen zur DNA-Reparatur verwendete Licht.

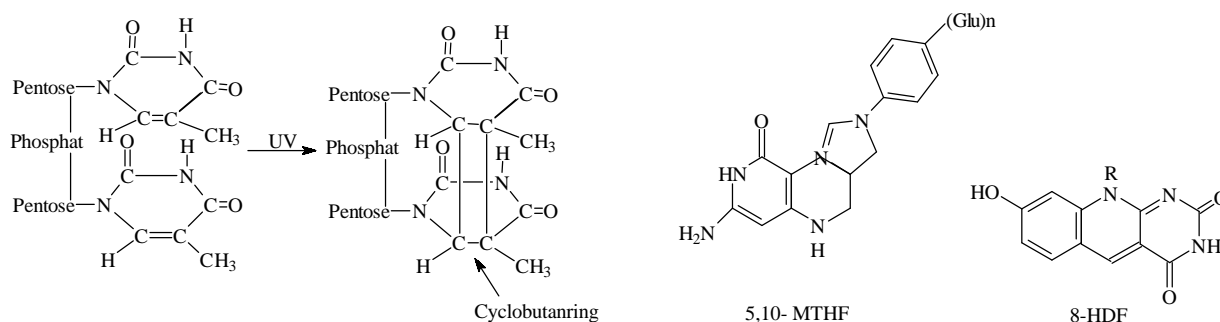


Abb. 30 Thymindimerbildung und Cofaktoren von DNA-Photolyasen

Eine Unterform der Folatklasse enthält nur FAD und kein sekundäres Chromophor [Kato *et al.*, 1997]. Die Aktivität ist dennoch erhalten. Dies deckt sich auch mit dem Befund, daß die Eliminierung von 5,10-MTHF aus anderen Photolyasen der Folatklasse keinen Einfluß auf die enzymatische Aktivität hat. Die Entfernung von 8-HDF führt andererseits zur weitgehenden Inaktivierung der Photolyasen vom Deazaflavin-Typ [Sancar, 1994].

Photolyasen beider Klassen zeigen untereinander eine sehr starke Homologie im C-terminalen Bereich, bis 60% Identität innerhalb der 140 C-terminalen Aminosäuren. In diesem Bereich sind die DNA-Bindungsdomäne und die Bindungsstellen für FAD lokalisiert. Im N-terminalen Bereich weisen die Photolyasen eine weitaus stärkere Variabilität auf (vgl. auch Abb. 25).

4.6.1 Untersuchung der DNA-Photoreparatur in *M. smegmatis*

Für Actinomyceten ist bekannt, daß sie sehr artspezifisch über Mechanismen der DNA-Photoreparatur verfügen. So ist für *S. griseus* eine DNA-Photolyase der Deazaflavinklasse beschrieben [Kobayashi *et al.*, 1989]. *S. lividans* besitzt ein noch nicht charakterisiertes Photoreparatursystem, wohingegen in *S. coelicolor* ein solches System fehlt [Hopwood *et al.*, 1984]. Nach dem Abschluß der Genomprojekte für *M. tuberculosis* und *M. leprae* stellte sich heraus, daß diese keine Komponenten der DNA-Photoreparatur besitzen.

Nach der Sequenzierung von *phrA* aus *M. smegmatis* sollte die DNA-Photoreparatur in *M. smegmatis* untersucht werden. Hierfür wurde eine drei Tage alte Vorkultur von *M. smegmatis* 1:400 in HMG verdünnt. 900 ml dieser Verdünnung wurden auf HMG-Platten ausplattiert. Unmittelbar nach dem Trocknen wurden die Platten einzeln mit UV-Licht (10W, 11 cm) bestrahlt und bei Tageslicht mit zusätzlich 75W Weißlicht oder im Dunkeln bei 30°C gelagert.

Wie in Tabelle 10 zu erkennen ist, sind unter den gewählten Bedingungen jeweils ca. 5 mal mehr Zellen in der Lage im Licht zu wachsen als im Dunkeln. Das bedeutet eine etwa um den Faktor 5 höhere Abtötungsrate im Dunkeln. Das ist ein eindeutiger Hinweis auf das Vorliegen eines DNA-Photoreparatursystems in *M. smegmatis*.

Belichtungsdauer	Kolonien pro Platte bei Inkubation im Licht bei 30°C	Kolonien pro Platte bei Inkubation im Dunkeln bei 30°C
0	Rasen	Rasen
30 sec	ca. 1000	ca. 200
1 min	ca. 500	95
2 min	120	45
3 min	91	20
5 min	52	15

Tabelle 10: DNA-Photoreparatur in *M. smegmatis*

Ein Aliquot einer drei Tage alten Flüssigkultur von *M. smegmatis* wurde 1:400 in HMG verdünnt. Je 1ml μ l dieser Lösung wurde auf HMG Agarplatten ausgebracht. Nach dem Trocknen wurden die Platten mit UV-Licht bestrahlt (10 W, 11 cm). Unmittelbar im Anschluß wurden die Platten entweder im Dunkeln oder bei Tageslicht mit zusätzlicher Beleuchtung (Weißlicht 75W, 40 cm) bei 30°C inkubiert. Nach drei Tagen wurden die Kolonien ausgezählt.

4.6.2 Transkription von *phrA* in *M. smegmatis*

Da *M. smegmatis* über DNA-Photoreparatur verfügt, sollte untersucht werden, ob diese durch *phrA* vermittelt wird. Dies sollte mittels Northern Blots von gesamt RNA aus *M. smegmatis* durchgeführt werden. Es ist bekannt, daß die Transkription von DNA-Photolyasen stark durch DNA-schädigende Agenzien, wie UV-Licht und H_2O_2 induzierbar ist [Sebastian *et al.*, 1990; Mitani and Shima, 1995]. Zudem konnte in der DNA Sequenz von pMF11 eine putative Promotorsequenz identifiziert werden, die durch alternative (ECF) Sigmafaktoren bei oxidativen Streß erkannt werden könnte [Fernandes *et al.*, 1999]. Aus diesem Grund wurde versucht auch die Transkription von *phrA* zu induzieren. Hierfür wurden 2 Tage alte Flüssigkulturen mit 125 μ M H_2O_2 versetzt und weiter inkubiert [Dhandayuthapani *et al.*, 1996]. Zu verschiedenen Zeiten wurde die gesamt RNA isoliert und in Northern Analysen untersucht. In einem ähnlichen Ansatz wurden 2 Tage alte HMG-Agarplatten mit UV-Licht bestrahlt, die Platten im Licht bei 30°C inkubiert und zu verschiedenen Zeiten wurde erneut die gesamt RNA isoliert.

Es war in keinem Falle möglich mRNA, die mit *phrA* als radioaktive Sonde hybridisiert, nachzuweisen. Dies könnte an einer sehr geringen Transkriptionsrate von *phrA* liegen. Möglicherweise waren auch die in Anlehnung an andere Untersuchungen gewählten Parameter für *M. smegmatis* ungeeignet. Ein weiterer möglicher Grund wäre, daß *phrA* ein Pseudogen ist. Die Funktion von *phrA* in der DNA-Photoreparatur in *M. smegmatis* sollte somit indirekt nachgewiesen werden.

4.6.3 Heterologe Expression von *phrA* in *E. coli*

Wegen der Nichtnachweisbarkeit der *phrA* Expression in *M. smegmatis*, sollte das Gen heterolog in *E. coli* exprimiert werden, um die enzymatische Aktivität *in vitro* nachzuweisen.

Zur Expression in *E. coli* wurde erneut eine N-terminale His6-Fusion durch Verwendung des Expressionsvektors pQE30 angefügt. Die Generierung der Restriktionschnittstellen erfolgte durch Amplifikation von *phrA* mit folgenden Primern:

msPLf: 5'-CCAACCTGGGATCCCTCAGGCGCGACC-3'

msPLr: 5'-ATGCGCGCAAAGCTTCTACGCCTCGCC-3'

Als Template diente pMF11. Die PCR-Bedingungen wurden analog 3.6 gewählt.

Das amplifizierte 1319 bp Fragment enthält das *phrA* Gen mit dem natürlichen Stopcodon und wird durch eine *Bam*HI und eine *Hind*III Schnittstelle flankiert.

Nach der Extraktion des Fragments aus einem Agarosegel, wurde es mit *Bam*HI und *Hind*III behandelt und zunächst in pTZ18U (*Bam*HI/*Hind*III) kloniert und in *E. coli* DH5 α transformiert. Das so erhaltene Plasmid pMFPL1 wurde zur Kontrolle sequenziert.

Nachfolgend wurde das Fragment aus pMFPL1 erneut mit *Bam*HI/*Hind*III ausgeschnitten und in pQE30 (*Bam*HI/*Hind*III) kloniert. Zur Konstruktion des Expressionsplasmids wurde zunächst in *E. coli* JM109 transformiert und das entstandene Plasmid pQEPL1 durch Restriktionsanalyse auf seine Richtigkeit überprüft. Nachfolgend wurde das Plasmid in *E. coli* M15 transformiert.

Da Vorversuche gezeigt hatten, daß His6-Phr1 bei einer Induktion mit 1 mM IPTG bei 37°C in *E. coli* M15 nicht löslich ist, wurde die Expression bei geringerer Temperatur und unter IPTG-Limitierung durchgeführt. Hierfür wurden 4 x 100 ml (2YT, Amp₁₀₀, Kan₂₅) mit je 1 ml einer 50 ml Vorkultur (2YT, Amp₁₀₀, Kan₂₅) angeimpft und bei 37°C geschüttelt. Bei einer OD₆₀₀ von 0,6 wurde mit 1 mM bzw. 10 μ M IPTG induziert und für weitere 4 Stunden bei 37°C bzw. 28°C über Nacht inkubiert. Aus je 2x2 ml wurden die Zellen abzentrifugiert (8.000 rpm, 1 min, RT). Ein Teil wurde mit 210 μ l 50 mM TRIS pH 8,0 und 90 μ l SDS-Probenpuffer versetzt und bei 95°C 5 min denaturiert. Die zweite Probe wurde mittels Ultraschall aufgeschlossen. Der Überstand und die Zelldebris wurde getrennt bei 95°C denaturiert. Die so gewonnen Proteinproben wurden auf einem 10%igen PAA-Gel analysiert.

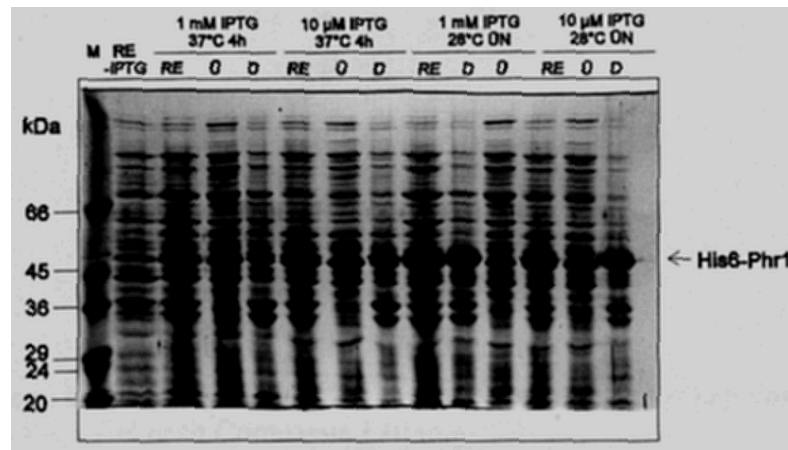


Abb. 31 Heterologe Expression von His6-Phr1 in *E. coli*

Auf ein 10%iges PAA-Gel wurden jeweils identische Mengen Rohextrakt (RE), löslicher Überstand (Ü) und unlösliche Zelldebris (D) aufgetragen. Im oberen Teil der Abbildung sind die Inkubations- und Induktionsbedingungen angegeben. Das Gel wurde Coomassie gefärbt.

Wie aus obiger Abbildung ersichtlich ist, war das Fusionprotein His6-Phr1 unter keinen der gewählten Bedingungen löslich. Auch der Versuch geringe und im Coomassie gefärbten Gel nicht erkennbare geringe lösliche Mengen von His6-Phr1 an eine Ni-Matrix zu binden hatte keinen Erfolg. Zieht man den Sequenzvergleich Abb. 25 zu rate, könnte die Unlöslichkeit von 6His-PHR1 auf die unkorrekte Faltung des Enzyms zurückzuführen sein. Der N-Terminus von PHR1 liegt in einem konservierten möglicherweise strukturelevanten Bereich.

Aus diesem Grund sollte das Protein ohne die aminoternale His-Fusion in *E. coli* exprimiert werden. Hierzu wurde das Fragment aus pQEPL1 mit *Bam*HI/*Hind*III ausgeschnitten und in pQE50 (*Bam*HI/*Hind*III) kloniert. Nach der Transformation in *E. coli* JM109 wurde das entstandene Plasmid pQEPL50 nachfolgend in *E. coli* M15 transformiert.

Es wurden 2 x 400 ml (2YT, Amp₁₀₀, Kan₂₅) mit je 5 ml einer 50 ml Vorkultur (2YT, Amp₁₀₀, Kan₂₅) angeimpft und bei 37°C geschüttelt. Bei einer OD₆₀₀ von 0,8 wurde mit 100 µM IPTG induziert und für weitere 4 Stunden bei 37°C inkubiert.

Die Zellen wurden abzentrifugiert (20 min, 10.000 rpm, 4°C) und in Photolyasepuffer ohne KCl resuspendiert (4 ml je g Zellen). Nach dem Zellaufschluß ohne Zugabe von DNase wurde zentrifugiert (20 min, 15.000 rpm, 4°C), der lösliche Proteinextrakt wurde über eine Blue Sepharose Säule gegeben und die gebundenen Proteine in einem KCl Gradienten von 0-1 M in Photolyasepuffer eluiert.

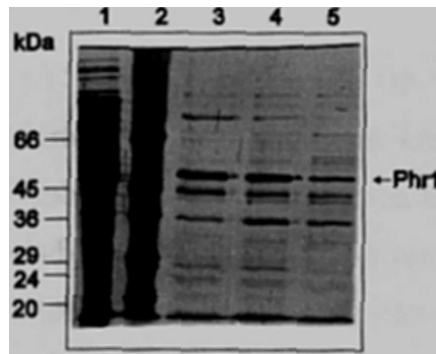


Abb. 32 Heterologe Expression und Reinigung von Phr1 ohne HisTag aus *E. coli*

10%iges PAA Gel nach Coomassie Färbung

Aufgetragen wurden: 1 gesamt Protein von *E. coli*+pQEPL1 induziert mit 1 mM IPTG nach 4 stündiger Inkubation, 2 Molekulargewichtsmarker, 3 - 5 Eluate der Blue Sepharose Affinitätschromatographie bei ca. 100 mM KCl

Wie in Abb. 32 zu erkennen ist, war das so exprimierte Protein in *E. coli* M15 löslich. Aufgrund seiner DNA-bindenden Eigenschaften, war es möglich, das Protein mit ca. 50 kDa an Blue-Sepharose anzureichern. Die Proteinfractionen zeigen ein geringes lokales Absorptionsmaximum bei ca. 360 nm. Das deutet auf die Anwesenheit von FAD und das Fehlen des zweiten Cofaktors hin, wie dies schon aus dem Fehlen der 5,10,-MTHF Bindungsstellen in der Sequenz vermutet wurde. Dieses Protein war in einem Kontrollexperiment mit dem Rohextrakt von *E. coli* + pQE50 nach Induktion mit IPTG nicht nachzuweisen (nicht gezeigt).

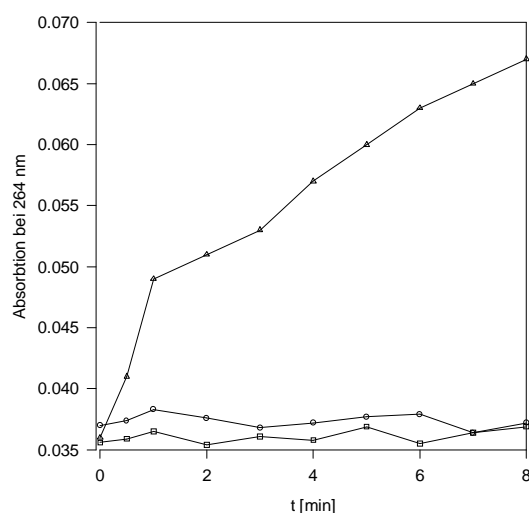


Abb. 33 *In vitro* Aktivität von PHR1 exprimiert in *E. coli*

Gemessen wurden jeweils Proteinfractionen, die bei 100 mM KCl von der Blue-Sepharose eluierten. Es wurden jeweils 2 µg Protein eingesetzt.

--Δ-- PHR1 im Licht inkubiert -- -- PHR1 im Dunkeln inkubiert

--○-- *E. coli* + pQE50 im Licht inkubiert

In einem Test entsprechend 3.11.8 wurde bestrahlte DNA ohne Zusatz von Cofaktoren eingesetzt. Die pQEPL50 kodierte Photolyase-Aktivität konnte in diesem Ansatz *in vitro* nachgewiesen werden. Wie in Abb. 33 dargestellt, werden bei der gewählten Belichtung ca. 80% der UV induzierten Thymindimere gespalten. Es ist somit möglich ausgehend von *phrA* eine funktionell aktive DNA-Photolyase in *E. coli* zu exprimieren.

4.6.4 Heterologe Expression von *phrA* in *Streptomyces coelicolor*

Die nächste Aufgabe bestand darin, *phrI* in *S. coelicolor* funktionell zu exprimieren, da dieser Organismus keine Photolyaseaktivität besitzt, jedoch in der Lage ist, mögliche Cofaktoren zu synthetisieren [Mayerl *et al.*, 1990].

Zur Expression von *phrA* wurde ein pIJ702 analoges Expressionssystem verwendet. In diesem System wird das heterologe Gen unter der Kontrolle des *mel*-Promotors exprimiert. Der Startpunkt der Translation liegt dabei auf dem ATG Startcodon des *melC1* Gens, welches Teil einer *SphI* Schnittstelle ist. Durch die Generierung einer *SphI* Schnittstelle mittels PCR auf das Startcodon des zu untersuchenden Gens ist man in der Lage, durch „in frame“ Klonierung, das heterologe Gen unter die direkte Kontrolle des *mel*-Promotors zu bringen.

Zur Generierung der notwendigen Schnittstellen wurden folgende Primer verwendet.

pQE30-FOR: 5'-GAGGAGGAATTCAGCATGCGAGGATCGCAT-3'

pQE30-REV: 5'-AGTCCAAGCTCAGCTAATTAAGCT-3'

Der Vorwärts-Primer bindet an pQE30 im Bereich der *EcoRI* Schnittstelle, die stromaufwärts vom Startcodon und den 6 Histidincodons liegt. Der Primer pQE30FOR generiert auf dem Startcodon eine *SphI* Schnittstelle. Dadurch bleibt der für 6 Histidine codierende Bereich erhalten, die Expression des Gens erfolgt in Streptomyceten als HexaHis-Fusionsprotein. Der Gegenprimer überspannt das 3'-Ende der MCS („multiple cloning site“) von pQE30.

Als Template zur Amplifizierung von *phrA* diente pQEPL1. Das amplifizierte ca. 1300 bp Fragment wurde zunächst *HindIII*/*EcoRI* in pTZ18U kloniert, so entstand pPLHis18. Zur Kontrolle wurde das Insert ansequenziert. Da *phrA* eine interne *SphI* Schnittstelle aufweist, wurde pPLHis18 zunächst mit *HindIII* linearisiert und anschließend mit *SphI* partiell verdaut. Das zu Beginn der *SphI* Behandlung entstehende 1300 bp *HindIII*/*SphI* Fragment wurde in den pIJ702 verwandten *E.coli*/*Streptomyces* Shuttle-Vektor pSPIJ002 (siehe Abb. 11) *HindIII*/*SphI* kloniert und zunächst in *E. coli* transformiert. Der so entstandene Vektor pPL002 wurde mit verschiedenen Restriktionsenzymen kontrolliert und in *S. coelicolor* transformiert.

Transformanten wurden isoliert und auf die Präsenz des Konstruktes getestet. Ein plasmidtragender Stamm wurde in Flüssigkultur angezüchtet. Aliquots wurden entsprechend der OD₆₀₀ verdünnt und etwa die gleiche Anzahl von Zellen auf R5 Agarplatten ausplattiert. Unmittelbar nach dem Trocknen wurden die Platten mit UV-Licht bestrahlt (10W, 11 cm) und im Dunkeln oder unter Weißlicht bei 30°C inkubiert. Nach drei Tagen wurden die Kolonien ausgezählt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 10 gezeigt.

Belichtungsdauer	Kolonien pro Platte bei Inkubation im Licht bei 30°C		Kolonien pro Platte bei Inkubation im Dunkeln bei 30°C	
	<i>S. coelicolor</i>	<i>S. c.</i> + pPL002	<i>S. coelicolor</i>	<i>S. c.</i> + pPL002
0	Rasen	Rasen	Rasen	Rasen
30 s	ca. 700	ca. 2000	ca. 700	ca. 700
1 min	552	ca. 1000	514	366
2 min	278	405	251	334
3 min	270	346	260	304
5 min	259	269	257	263

Tabelle 11 pPL002 vermittelte DNA-Photoreparatur in *S. coelicolor*

Ein Aliquot einer drei Tage alten Flüssigkultur des entsprechenden *S. coelicolor* Stammes wurde verdünnt. Je 1ml µl dieser Lösung wurde auf R5 Agarpalatten ausgebracht. Nach dem Trocknen wurden die Platten mit UV-Licht bestrahlt (10 W, 11 cm). Unmittelbar im Anschluß wurden die Platten entweder im Dunkeln oder bei Tageslicht mit zusätzlicher Beleuchtung (Weißlicht 75W, 40 cm) bei 30°C inkubiert. Nach drei Tagen wurden die Kolonien ausgezählt.

Es ist erkennbar, daß insbesondere bei kurzen Bestrahlungszeiten, *S. coelicolor* mit pPL002 eine deutlich erhöhte Überlebensrate zeigt. Beim Wildtyp ist wie erwartet keine DNA-Photoreparatur nachzuweisen. Die Überlebensrate von *S. coelicolor* mit pPL002 ist im Dunkeln nicht von der des Wildtyps zu unterscheiden.

Zum sicheren Nachweis der Photolyase Aktivität in pPL002 tragendem *S. coelicolor* sollte das Protein analog 4.6.3 angereichert und *in vitro* nachgewiesen werden.

Zu diesem Zweck wurden sechs R5 Agarpalatten mit *S. coelicolor* + pPL002 drei Tage im Licht bei 30°C inkubiert. Das Mycel dieser Platten wurde in Photolyasepuffer ohne KCl resuspendiert und mittels French Press aufgeschlossen. Nach der Zentrifugation wurde der erhaltene Rohextrakt über Nacht gegen 2x2 l Photolayasepuffer dialysiert. Die so behandelte Probe wurde einer Affinitätschromatographie an Blue Sepharose unterworfen. Die Elution erfolgte in einem linearen Gradienten von 0-1 M KCl in Photolyasepuffer. Wie in Abb. 34 erkennbar ist, konnte so ein Protein von ca. 52 kDa angereichert werden. Die

Proteinfraktionen zeigten im UV/Vis-Spektrum das selbe Verhalten wie schon das aus *E. coli* gereinigte PHR1. Im Wildtyp war dieses Protein unter den gleichen Bedingungen nicht nachweisbar (nicht gezeigt).

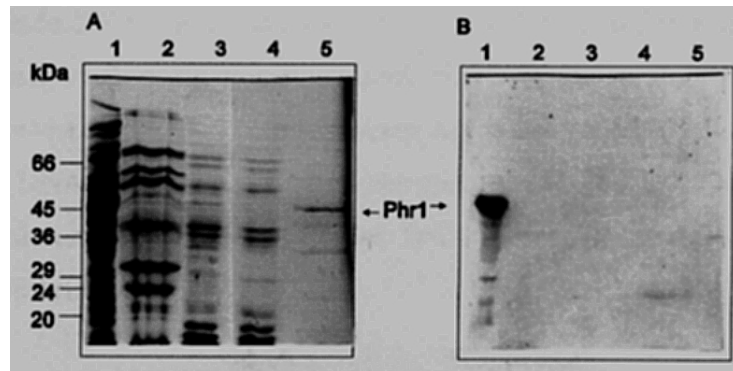


Abb. 34 Reinigung von rekombinantem PHR1 aus *S. coelicolor*

A: 10%iges PAA Gel nach Coomassie Färbung

B: Immunodetektion mit anti-Penta-His-Antikörpern

Aufgetragen wurden: 1 gesamt Protein von *E. coli*+pQEPL1 induziert mit 1mM IPTG nach 4 stündiger Inkubation, 2 *S. livians* + pPL002 Rohextrakt, 3 *S. coelicolor* + pPL002 Rohextrakt, 4 *S. coelicolor* + pPL002 nicht an Blue Sepharose gebundene Proteine, 5 bei 100 mM KCl eluiertes Protein

Zur Kontrolle wurde zusätzlich ein Western Blot mit Anti-Penta-His-Antikörpern durchgeführt. Das angereicherte Protein wies jedoch keine Immunreaktion auf. Es könnte sich somit um einen Artefakt handeln. Es ist allerdings auch möglich, daß der His-Tag von *S. coelicolor* eigenen Proteasen abgespalten wurde.

Aus diesem Grund sollte die DNA-Photolyaseaktivität enzymatisch nachgewiesen werden.

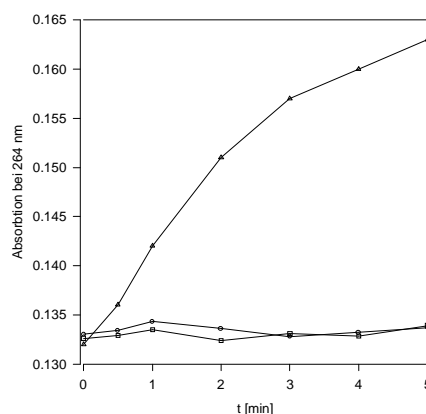


Abb. 35 Thymindimerspaltung von PHR1, heterolog exprimiert in *S. coelicolor*

Gemessen wurden jeweils Proteinfraktionen, die bei 100 mM KCl von der Blue-Sepharose eluierten. Je 2 µg Protein wurden in den Tests eingesetzt.

--Δ-- PHR1 im Licht inkubiert -- ◻ -- PHR1 im Dunkeln inkubiert

--○-- *S. coelicolor* im Licht inkubiert

Aus Abb. 35 geht hervor, das in *S. coelicolor* pPL002 vermittelte DNA-Photoreparatur nachweisbar war. Die Effizienz der Thymindimerspaltung unterscheidet sich nicht von der mit PHR1 aus *E.coli* gemessenen Aktivität.

Mit diesen Experimenten wurde eindeutig nachgewiesen, daß *phrA* für eine thymindimerspaltende DNA-Photolyase kodiert. Es ist möglich, ausgehend von *phrA*, sowohl in *E. coli* als auch in *S. coelicolor* funktionell aktive Photolyasen zu exprimieren. Diese Funktion konnte *in vivo* und *in vitro* nachgewiesen werden. Um die Frage nach der Beteiligung von PHR1 an der DNA-Photoreparatur in *M. smegmatis* abschließend zu untersuchen wurden, Southern Hybridisierungen an chromosomaler DNA von *M. smegmatis* bei sehr geringer Stringenz durchgeführt.

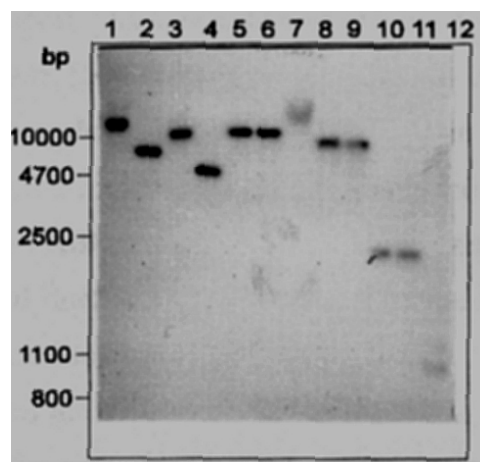


Abb. 36 Southern Blot chromosomaler DNA von *M. smegmatis* mit *phrA* als Sonde

Auf einem 0,8%igen Agarosegel wurden je 10 µg chromosomaler DNA aus *M. smegmatis* nach der Behandlung mit verschiedenen Restriktionsenzymen aufgetragen. Als Sonde diente das radioaktiv markierte *phrA* Gen aus pMFPL1. Die Membran wurde bei 55°C hybridisiert und bei 55°C mit 2xSSC + 0,1% SDS gewaschen.

1 <i>Eco</i> RI	6 <i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III	11 <i>Sst</i> I
2 <i>Eco</i> RI/ <i>Bgl</i> II	7 <i>Hind</i> III	12 <i>Sst</i> I/ <i>Xho</i> I
3 <i>Bgl</i> II	8 <i>Hind</i> III/ <i>Pst</i> I	
4 <i>Bgl</i> III/	9 <i>Pst</i> I	
5 <i>Bam</i> HI	10 <i>Pst</i> I/ <i>Sst</i> I	

Wie in Abb. 36 zu erkennen ist, war in den Southern Blot bei der gewählten niedrigen Stringenz der Hybridisierungs- und Waschbedingungen (55°C) nur ein Signal mit *phrA* als Sonde nachweisbar. Aufgrund der sehr starken Homologie im C-terminalen Bereich von Photolyasen, die sich auch auf DNA-Ebenen widerspiegeln sollte, ist dies ein deutlicher Hinweis darauf, daß *M. smegmatis* keine weiteren Photolaysegene besitzt. PHR1 ist somit sehr wahrscheinlich das Genprodukt, daß für die DNA-Photoreparatur in *M. smegmatis* verantwortlich ist.

5 Diskussion

Die Streptomyceten sind eine Gruppe filamentöser Bodenbakterien, die zur Ordnung der *Actinomycetales* gehören. Sie sind industriell bedeutende Produzenten von Wirkstoffen und Enzymen. Sie haben einen komplexen Lebenszyklus, der durch die Ausbildung von Substratmycel, Luftmycel und Sporen charakterisiert ist. Aus diesen Gründen sind Streptomyceten interessante Untersuchungsobjekte bei mannigfaltigen Fragestellungen der mikrobiellen morphologischen Differenzierung und der Biotechnologie.

Fortschritte in der Untersuchung vieler Primär- und Sekundärstoffwechselwege in Streptomyceten ergaben, daß diese Organismen, wie viele andere, ebenfalls Proteine enthalten, die in Proteinfaltung, Proteintransport oder Stressantwort involviert sind.

Neben den Hsps wie z.B. DnaJ und DnaK [Bucca *et al.*, 1995] oder Proteine der Sec-Familie [Blanco *et al.*, 1996] wurden auch Faltungshelferenzyme aus der Familie der Peptidyl-prolyl-*cis/trans*-Isomerasen (PPIasen) in Streptomyceten nachgewiesen [Pahl and Keller, 1992].

Die Präsenz von PPIasen der FKBP-Typs in dieser Organismengruppe stellt einen besonders interessanten Aspekt dar, sind doch Streptomyceten selbst die Produzenten von FK506 und Rapamycin, den hochwirksamen Inhibitoren der FKBP. Die Rolle der FKBP in Streptomyceten ist unklar. Das gilt sowohl für das cytosolische FKBP12, als auch für das in seiner Struktur ungewöhnliche, membrangebundene FKBP33, welches aus zwei FKBP-Domänen besteht.

5.1 Disruption und Replacement von *fkba* aus Streptomyceten

Schon seit der Entdeckung der PPIasen, als Katalysatoren der Prolylisomerisierung, wird eine Funktion dieser Enzyme bei Proteinfaltungsprozessen, dem Proteintransport oder als Chaperones vermutet. In dieser Arbeit sollten die beiden FKBP von Streptomyceten durch Gendisruption oder Genreplacement in verschiedenen Streptomyceten eliminiert werden, um aus dem Phänotyp Rückschlüsse auf die Funktion der Enzyme ziehen zu können.

Die hier beschriebene Verwendung eines internalen Fragments des *fkba* Gens codierend für FKBP12 aus *S. chrysomallus* zur Gendisruption von *fkba* in *S. lividans* oder *S. coelicolor* führte in keinem Fall zur Disruption dieses Gens. Es wurde angenommen, daß die Homologie der Gene von *S. chrysomallus* und der anderen Streptomyceten für eine erfolgreiche homologe Rekombination zu gering ist. Es wurden daher Disruptionen mit Fragmenten aus dem *fkba* Gen aus *S. coelicolor* durchgeführt, um die Gene in *S. coelicolor* und *S. lividans* zu inaktivieren. Es war dadurch tatsächlich möglich stabile Integrationsmutanten zu erhalten. Diese Mutanten besaßen im Falle von *S. lividans* einen einheitlichen Phänotyp, sie zeigten die

Ausbildung eines braunen Sporenpigments. Das ließ vermuten, daß die Integration des eingesetzten Genfragments aus *S. coelicolor* an definierten Stellen des *S. lividans* Genoms stattgefunden hatte. Jedoch zeigten Analysen der chromosomalen DNA, daß das *fkba* Gen nicht disruptiert war, sondern es sich um ektopische Integrationen handelte. Im Gegensatz zu *S. lividans* zeigten Insertionsmutanten von *S. coelicolor* keinen auffälligen Phänotyp. Die Untersuchung der DNA ergab für jede Mutante unterschiedliche Orte der Vektorintegration. Das *fkba* Gen war in keinem Fall von der Insertion betroffen.

Jedoch zeigten diese Experimente, daß mit Konstrukten, ausgehend vom *fkba* Gen aus *S. coelicolor* mit höherer Frequenz Insertionen im Genom von *S. coelicolor* und *S. lividans* zu beobachten waren, als dies mit *fkba* aus *S. chrysomallus* der Fall war. Das ausschließliche Auftreten von ektopischen Integrationen, die in *S. lividans* zudem an definierten Stellen im Genom auftreten, läßt darauf schließen, daß eine Insertionsdisruption in *fkba* unter den gewählten Bedingungen zu keinen lebensfähigen Phänotypen führt. Mögliche Gründe hierfür sind eine essentielle Funktion des FKBP12 in Streptomyceten, was den ersten derart beschriebenen Fall in einem Prokaryonten darstellen würde. Möglicherweise entstehen bei der Mutation von *fkba* auch temperatursensitive Mutanten, diese würden in diesem System, mit Selektion durch Temperaturerhöhung, ebenso wie Letalmutationen nicht erfaßt werden.

Deswegen wurde versucht *fkba* in *S. lividans* und *S. coelicolor* komplett durch eine Resistenzkassette zu ersetzen. Hierbei ist keine Temperaturerhöhung notwendig. Bei der Verwendung von Plasmid-DNA aus *E. coli*, die neben der Resistenzkassette auch je ca. 2 kb des 5'- und des 3'-Bereiches des *fkba* Gens enthielten, konnten keine Integrationen beobachtet werden.

Setzte man jedoch statt der *E. coli* Vektoren analoge *Streptomyces* Vektoren ein, zeigten sich bei diesen deutliche Instabilitäten. Das war ein Hinweis auf Rekombinationsereignisse zwischen Genom und Plasmid. Jedoch konnte in keinem Fall der Austausch von *fkba* durch die Resistenzkassette nachgewiesen werden.

Eine Möglichkeit, die aufgrund dieser Ergebnisse mögliche wichtige Funktion von *fkba* zu untersuchen, wäre die Verwendung von *Streptomyces* Stämmen zum Genreplacement, die *fkba* als zusätzliche Kopie auf einem autonomen Plasmid besitzen. Beim Genreplacement müßte dann das chromosomale Gen eliminiert werden. Durch Verwendung eines induzierbaren Expressionssystems (z.B. Expression unter thiostreptoninduzierbaren Promotoren) oder von Plasmiden, die durch Temperaturerhöhung eliminierbar sind, könnte dann sogar ein letaler Defekt nachgewiesen werden.

5.2 Disruption und Replacement von *fkbb* aus Streptomyceten

Neben FKBP12 enthalten Streptomyceten ein weiteres FKBP. Es handelt sich um ein in seiner Struktur bisher nur in dieser Organismenklasse nachgewiesenes FKBP33. Das Protein enthält zwei PPIase-Domänen und ist über einen Lipidanker in der Zellmembran verankert [Pahl and Keller, 1994]. Diese Struktur legte eine Funktion ähnlich dem Zweidomänenparvulin SurA aus *E. coli* nahe. Um dies zu untersuchen, wurden Gendisruptionen mit internalen Sequenzen des *fkbb* aus *S. coelicolor* durchgeführt, da mit den Disruptionskonstrukten, die sich vom *fkbb* aus *S. chrysomallus* ableiten wie schon bei *fkba* aus *S. chrysomallus* keine Ergebnisse erzielt werden konnten.

Mit dem ersten Integrationskonstrukt sollte nur die C-terminale PPIase-Domäne inaktiviert werden, da dies zu Mutanten führen sollte, die ein aus der ersten Domäne und dem Membrananker bestehendes verkürztes FKBP33 enthalten würden. Wenn diese aktive Domäne die Funktion der zweiten übernehmen kann, bliebe die Lebensfähigkeit der Mutanten erhalten. Mit diesen Konstrukten gelang es in *S. lividans* und *S. coelicolor* mit hoher Frequenz Insertionsmutanten herzustellen. Der Großteil dieser Mutanten zeigte bei der Analyse der chromosomalen DNA, daß die Vektorintegration unmittelbar hinter der für die erste Domäne von FKBP33 codierenden DNA Sequenz stattgefunden hatte. Diese Mutanten sollten somit in der Lage sein, ein um eine Domäne verkürztes FKBP33 zu exprimieren. In der Tat gelang es ein solches neues Protein in der Zellmembran der Mutanten nachzuweisen, gleichzeitig fehlte intaktes FKBP33. In alternden Kulturen von *S. chrysomallus* ist ein Protein vergleichbarer Größe zwar ebenfalls nachweisbar, dieses ist jedoch höchstwahrscheinlich ein durch Proteolyse entstandenes Abbauprodukt von FKBP33. Die Insertionsmutanten zeigten keine phänotypischen Abweichungen zum Wildtyp. Das bedeutet, sollte das FKBP33 eine essentielle Funktion in der Zelle besitzen, kann diese auch durch das Eindomänenenzym oder weitere PPIasen wie z.B. FKBP12 übernommen werden.

Die Versuche auch die erste Domäne von FKBP33 zu inaktivieren scheiterten in analog durchgeführten Experimenten. Es konnten keine Klone erhalten werden, die eine Integration im *fkba* Gen trugen. Wie schon im Falle von *fkba* wies die hier erneut aufgetretene geringe Rekombinationsfrequenz und das Auftreten von ektopischen Integrationen darauf hin, daß das Gen *fkbb* in *S. coelicolor* nicht ausgeschaltet werden kann.

Der Versuch *fkbb* durch Genreplacement zu inaktivieren, führte ebenfalls nicht zur Auffindung von FKBP33 defizienten Streptomyceten. Die Ergebnisse weisen darauf hin, daß die N-terminale Domäne von FKBP33 für das Enzym und damit für dessen zelluläre Funktion eine wichtige Funktion besitzt. Möglicherweise ist daher eine Totalmutation in *fkbp33* gleichermaßen letal wie eine Doppelmutation von SurA und PpiD in *E. coli* [Dartigalongue

and Raina, 1998]. Die Untersuchung dieser Hypothese könnte wie für *fkfA* beschrieben, durch die Verwendung von autonomen Plasmiden zur Expression von *fkfB* und nachfolgendes Replacement untersucht werden.

5.3 Charakterisierung von FK506 Bindungsproteinen in Mycobakterien

Bei der Durchsicht von Mycobakterien, einer anderen Gruppen der Actinomyceten, nach der Anwesenheit von FKBP's wurde im Cytosol von schnellwachsenden Mycobakterien wie *Mycobacterium smegmatis* und *Mycobacterium phlei* ein Protein nachgewiesen, welches mit Antikörpern gegen das FKBP12 aus *S. chrysomallus* eine starke Immunreaktion zeigt. Das Protein hatte der SDS-PAGE eine Größe von etwa 30 kDa.

Die Genomprojekte für *Mycobacterium tuberculosis* und *Mycobacterium leprae* offenbarten, daß in diesen Vertretern der langsamwachsenden Mycobakterien keine für FKBP's kodierenden Gene vorhanden sind. Es konnten nur Gene für Cyclophiline nachgewiesen werden. Diese Cyclophiline gehören wie auch in *S. chrysomallus* unterschiedlichen phylogenetischen Klassen an [Pahl *et al.*, 1997].

Aufgrund dieses sehr interessanten Befundes wurde *M. smegmatis* auf das Vorhandensein von FK506 inhibierbaren PPIase-Aktivitäten untersucht. Es wurde jedoch eine PPIase der FKBP-Familie identifiziert, die im SDS Gel einer Bande von ca. 22 kDa zuzuordnen war. Überraschenderweise zeigte das gereinigte Protein aber keine Immunreaktivität mit anti-FKBP12 Antikörpern. Das weist darauf hin, daß die immunreaktive Bande nicht das FKBP aus *M. smegmatis* repräsentiert. Weitere durch mit FK506 hemmbare PPIasen waren im ersten Schritt der Reinigung des FKBP nicht nachweisbar.

Das FKBP wurde gereinigt und partiell sequenziert. Dabei ergaben sich für die Aminosäuresequenz der internen tryptischen Fragmente, sowie für die N-terminale Sequenz typischerweise sehr hohe Homologien zu FKBP12 aus den Actinomyceten *Streptomyces chrysomallus* und *Corynebacterium glutamicum*.

Mit Hilfe der reversen Genetik gelang es, das Gen für das FKBP zu klonieren. Die von der DNA-Sequenz abgeleitete Aminosäuresequenz ergab, daß das Gen für ein FKBP der Masse von 12,9 kDa handelt, das hohe Ähnlichkeiten zu den aus Actinomyceten beschriebenen FKBP12 aufweist. Das Gen liegt als „single copy“ im Genom von *M. smegmatis* vor. Die Aminosäuresequenz wies den zuvor bestimmten N-Terminus auf. In den internalen Aminosäuresequenzen zeigte sich eine Übereinstimmung von 85%. Damit konnte das identifizierte Gen klar dem zuvor gereinigten Protein zugeordnet werden.

Die enzymatische Untersuchungen des FKBP12, in Hinblick auf Substratspezifität und Inhibierbarkeit mit FK506 und Rapamycin, wurden mit dem in *E. coli* exprimierten Protein durchgeführt. FKBP12 aus *M. smegmatis* zeigt die für FKBP's typische Substratspezifität und ist durch nanomolare Mengen FK506 und Rapamycin hemmbar.

Die Aufklärung der Funktion von FKBP12 in der bakteriellen Zelle könnte in Mycobakterien möglich sein. Zum einen weisen die Ergebnisse darauf hin, daß *M. smegmatis* nur ein cytoplasmatisches FKBP enthält. Zum anderen liegen mit den langsamwachsenden pathogenen Mycobakterien bereits natürliche FKBP defiziente Mutanten vor. Für *M. smegmatis* sind Methoden zur gerichteten Inaktivierung von Genen etabliert. So könnten FKBP defiziente schnellwachsende Mycobakterien im Vergleich mit ihren langsamwachsenden Verwandten untersucht werden.

Mit diesem Forschungsansatz wären möglicherweise neue Ergebnisse in Bezug auf Pathogenität, Wirtsspezifität und Wachstumsgeschwindigkeit der Mycobakterien zu erzielen.

5.4 Analyse des *fkB* Genlocus von *M. smegmatis*

5.4.1 Lokalisierung des Citratsynthasegens *citB*

Als weiteres Indiz der phylogenetischen Verwandtschaft innerhalb der Actinomyceten konnte in *M. smegmatis* wie auch in *C. glutamicum* im unmittelbaren 5'-Bereich von *fkBA* das Gen für eine Citratsynthase identifiziert werden [Eikmans *et al.*, 1994]. Die Ähnlichkeit der Sequenzen setzt sich auch im Promotorbereich des Citratsynthasegens fort. Auch der nichtcodierende 70 bp Bereich zwischen beiden Genen ist nahezu identisch. Diese Homologien könnten nicht nur für eine ähnliche Genomorganisation, sondern auch für identische Regulationsmechanismen dieser Gene in den beiden Organismen, sprechen. Aufgrund der Promotoranalyse kann für *citB* eine konstitutive Expression als sogenanntes „House keeping gene“ postuliert werden. Für *fkBA* aus *M. smegmatis* konnte die konstitutive Expression nachgewiesen werden. Beide Gene werden jedoch nicht cotranskribiert. So bleibt es unklar, ob *citB* tatsächlich konstitutiv exprimiert wird.

Die Citratsynthase (CitB) aus *M. smegmatis* gehört einer anderen phylogenetischen Gruppe an, als die von David *et al.* [1991] beschriebene Citratsynthase CitA.

5.4.2 Lokalisierung und Analyse des Gens für eine DNA-Photolyase (*phrA*)

Die weitere Analyse des *fkBA* Locus von *M. smegmatis* ergab, daß unmittelbar 3' von *fkBA* ein offener Leserahmen liegt, dessen abgeleitete Aminosäuresequenz hohe Ähnlichkeiten zu DNA-Photolyasen aufweist.

Erstaunlicherweise ist für *M. tuberculosis* auch das Fehlen dieser Enzymklasse beschrieben worden [Mizrahi and Andersen, 1998]. Möglicherweise ist das Fehlen eines lichtabhängigen DNA Reparatursystems ein Grund dafür, daß *M. tuberculosis* und andere langsamwachsende Mycobakterien nur als intrazelluläre Parasiten wachsen können, da ihnen effiziente DNA-Reparaturmechanismen fehlen. Auch vor dem Hintergrund der vermehrt auftretenden Multiresistenzen könnte das Fehlen der fehlerfreien DNA-Reparaturmechanismen wie Photoreparatur und Mismatchreparatur eine wesentliche Rolle spielen. Es wurde beschlossen, die DNA-Photoreparatur in *M. smegmatis* zu untersuchen.

Die Messung der DNA-Photoreparatur in *M. smegmatis* ergab eine um den Faktor 5 geringere Sterberate, wenn die Zellen nach der UV-Bestrahlung im Licht statt im Dunkeln inkubiert wurden. *M. smegmatis* verfügt somit über ein DNA-Photoreparatursystem. Weiterhin ergab die heterologe Expression von *phrA* und Reinigung des Genprodukts aus *E. coli* ein funktionell aktives Protein von ca. 52 kDa. Die Fähigkeit Thymindimere zu spalten, wurde am Modellsubstrat poly(dT) nachgewiesen. Somit war der sequenzierte offene Leserahmen als Gen einer funktionell aktiven DNA-Photolyase identifiziert worden.

Durch die Expression von *phrA* in *S. coelicolor* konnte diesem Streptomycceten, der keine eigene DNA-Photoreparatur besitzt, die Fähigkeit zur DNA-Photoreparatur vermittelt werden. Das partiell gereinigte Protein katalysierte die Thymindimerspaltung signifikant.

Die Spektralanalyse des angereinigten Phr1 aus *S. coelicolor* wie auch aus *E. coli* ergab, daß das Protein nur FAD als Cofaktor enthält. Dies ist auch für eine DNA-Photolyase aus *Thermus thermophilus* [Kato *et al.*, 1997] beschrieben, die im übrigen auch die höchste Ähnlichkeit aller Photolyasen mit dem mycobakteriellen Phr1 aufweist. Auch auf der DNA-Ebene ergibt sich eine sehr hohe Übereinstimmung zwischen den Genen aus *M. smegmatis* und *T. thermophilus*. Die Bindungsstellen für den zweiten Cofaktor (4,10-MTHF oder 8-HDF) sind im Vergleich zu *E. coli* und *S. griseus* mutiert. Möglicherweise sind die beiden Enzyme Prototypen einer DNA-Photolyase-Klasse, die aus einem gemeinsamen Vorgänger hervorgegangen sein könnten. Erst im Verlauf der Evolution sollte es zur Ausbildung der Bindungsstellen für den zweiten Cofaktor gekommen sein [Kanai *et al.*, 1997]. Die Bindung von 4,10-MTHF und 8-HDF führt zu einer Steigerung des Energietransfers auf FAD. Das zweite Chromophor ist jedoch in beiden Klassen für die *in vitro* Aktivität nicht essentiell [Kim and Sancar, 1993].

Leider war es nicht möglich, in Northern Blots an Gesamt-RNA aus *M. smegmatis* die mRNA von *phrA* nachzuweisen. Unter den gewählten Bedingungen war auch keine Induktion durch DNA-schädigende Agenzien nachzuweisen. Dieses negative Ergebnis könnte in ungünstig gewählten Induktionsbedingungen oder an einer zu geringen Transkriptionsrate liegen.

Da jedoch in Southern Blots auch bei sehr geringer Stringenz nur jeweils ein Fragment mit dem als Sonde verwendeten *phrA* Gen hybridisiert, ist das Genprodukt von *phrA* mit hoher Wahrscheinlichkeit dasselbe Protein, welches die beobachtete DNA-Photoreparatur in *M. smegmatis* katalysiert.

5.4.3 Lokalisierung eines hypothetischen Nat-homologen ABC-Transporters

Anschließend an *phrA* konnten zwei offene Leserahmen in entgegengesetzter Richtung identifiziert werden. Die Datenbankrecherche mit den abgeleiteten Aminosäuren ergab für den ersten Orf, die höchste Ähnlichkeit zur Membrankomponente (NatB) des Nat-ABC-Transporters aus *Bacillus firmus*. Weitere Ähnlichkeiten fanden sich nur zu zwei weiteren NatB-homologen Proteinen. Der zweite Orf zeigte die höchste Ähnlichkeit zur ATPase-Komponente des entsprechenden ABC-Transporters. Erstaunlicherweise ist der Nat-ABC-Transporter ein nur durch zwei Gene codierter ABC-Transporter. Dieses Gencluster wird durch Stress induziert [Cheng *et al.*, 1997]. Wie schon für FKBP's und Photolyasen festgestellt wurde, fehlen auch die Komponenten eines Nat-homologen ABC-Transporters in den langsamwachsenden Mycobakterien. Da der vermutlich für die ATPase kodierende Orf aber nicht mehr vollständig auf pMF11 vorlag, konnte dieses interessante Natrium-Transportsystem nicht weiter charakterisiert werden.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß Actinomyceten FK506-Bindungsproteine und andere PPIasen enthalten. Die Organisation der *fkf* Gene in Streptomyceten ist hierbei einzigartig. Sie liegen als Gencluster vor und sind im Laufe der Evolution möglicherweise als Ergebnis einer doppelten Genduplikation auseinander hervorgegangen.

In schnellwachsenden Mycobakterien und Corynebakterien liegt des FKBP12 als „single copy“ vor. Weitere FKBP's sind bisher in diesen Organismen nicht bekannt. Überraschenderweise fehlen FKBP's in pathogenen Mycobakterien völlig.

Auch Gene, die im Genom von *M. smegmatis* in der Umgebung von *fkfA* lokalisiert sind fehlen den langsamwachsenden Mycobakterien. Darunter befinden sich das Gen einer DNA-Photolyase sowie ein hypothetischer stressinduzierter Natrium-ABC-Transporter. Dies steht mit der Tatsache in Einklang, daß den langsamwachsenden Mycobakterien bestimmte Stressantwort- und DNA-Reparatursysteme fehlen.

Durch die weitere Untersuchung der Rolle der intrazellulären FKBP's in Mycobakterien und Streptomyceten, sowie der membranständigen FKBP's in Streptomyceten werden Einsichten in die Funktion dieser Proteine und deren Rolle bei der Interaktion dieser Mikroorganismen mit ihrer Umwelt oder ihren Wirten möglich.

6 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Morphologische Variabilität innerhalb der Actinomyceten [aus Schlegel, 1985]	7
Abb. 2 <i>Cis/trans</i> -Isomerisierung der Peptidyl-Prolyl-Bindung	10
Abb. 3 PPIase-Inhibitoren / Immunsuppressiva.....	11
Abb. 4 Restriktionskarte eines 5,4 kb Ausschnitts von <i>S. coelicolor</i> Cosmid I41	48
Abb. 5 Phänotyp von <i>S. lividans</i> Mutanten auf SOM-Medium.....	49
Abb. 6 Southern Blot von <i>Streptomyces</i> Mutanten nach der Gendisruption mit pGM177NS.....	50
Abb. 7 PCR zur Amplifikation von <i>fkfA</i> aus <i>Streptomyces</i> nach der Gendisruption mit pGM177NS.....	51
Abb. 8 Southern Blot von <i>Streptomyces</i> Mutanten nach der Gendisruption mit pGM390SS	53
Abb. 9 PCR an chromosomaler DNA vom Southern Blot von <i>Streptomyces</i> Mutanten nach der Gendisruption mit pGM390SS	55
Abb. 10 Immunoblot-Analyse an Membranen von Streptomyceten zum Nachweis eines verkürzten FKBP33 nach Gendisruption mit pGM390SS	56
Abb. 11 <i>E. coli</i> / <i>Streptomyces</i> Shuttle-Vektor pSPIJ002	59
Abb. 12 Immunodetektion von <i>M. smegmatis</i> Zellextrakten mit Antikörpern gegen FKBP12 aus <i>Streptomyces chrysomallus</i>	61
Abb. 13 PPIase-Aktivität in <i>M. smegmatis</i> Zellextrakten.	62
Abb. 14 Elutionsprofil der ResourceQ bei der Reinigung des FKBP aus <i>M. smegmatis</i>	63
Abb. 15 Reinigung von cytosolischem FKBP aus <i>M. smegmatis</i>	64
Abb. 16 Sequenzvergleich von Teilsequenzen des FKBP aus <i>M. smegmatis</i> mit der Aminosäuresequenz von FKBP12 aus <i>S. chrysomallus</i>	65
Abb. 17 PCR an chromosomaler DNA aus <i>M. smegmatis</i> zur Amplifikation eines internen Fragmentes des <i>fkf</i> Gens.....	67
Abb. 18 Autoradiogramm der Southern Hybridisierung von chromosomaler DNA aus <i>M. smegmatis</i>	68
Abb. 19 Southern Hybridisierung von pMF11 und pMF31	69
Abb. 20 Organisation und Sequenzierungsstrategie des <i>fkf</i> Genlocus aus <i>M. smegmatis</i>	69
Abb. 21 Nucleotidsequenz des Inserts von pMF11 und abgeleitete Aminosäuresequenzen	73
Abb. 22 Sequenzvergleich von FKBP12 aus <i>M. smegmatis</i> mit einigen bekannten FBBPs.....	75
Abb. 23 Phylogenetischer Baum von Citratsynthasen	76
Abb. 24 Sequenzhomologie zwischen CitB und Citratsynthasen.....	77
Abb. 25 Sequenzhomologie zwischen PHR1 und DNA-Photolyasen	78
Abb. 26 Sequenzvergleich von NatB zu Membranproteinen aus ABC-Transportern	80
Abb. 27 Reinigung von His6-FKBP12.....	82
Abb. 28 Inhibierung der PPIase-Aktivität von His6-FKBP12 durch Rapamycin und FK506	84
Abb. 29 Northern Blot an gesamt RNA aus <i>M. smegmatis</i> zum Nachweis der <i>fkfA</i> mRNA	85
Abb. 30 Thymindimerbildung und Cofaktoren von DNA-Photolyasen.....	87
Abb. 31 Heterologe Expression von His6-Phr1 in <i>E. coli</i>	90
Abb. 32 Heterologe Expression und Reinigung von Phr1 ohne HisTag aus <i>E. coli</i>	91
Abb. 33 <i>In vitro</i> Aktivität von PHR1 exprimiert in <i>E. coli</i>	91
Abb. 34 Reinigung von rekombinantem PHR1 aus <i>S. coelicolor</i>	94
Abb. 35 Thymindimerspaltung von PHR1, heterolog exprimiert in <i>S. coelicolor</i>	94
Abb. 36 Southern Blot chromosomaler DNA von <i>M. smegmatis</i> mit <i>phrA</i> als Sonde	95

7 Literaturverzeichnis

- Alarcón, C.M. and Heitman, J.** (1997): FKBP12 physically and functionally interacts with aspartokinase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **17**: 5968-5975
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman D.J.** (1997): Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database searchprograms. *Nucleic Acids Res.* **25**: 3389-3402
- Arber, S., Krause, K.H. and Caroni, P.** (1992): s-Cylophilin is retained intracellularly via the unique COOH-terminal sequence and colocalizes with the calcium storage protein calreticulin. *J. Cell. Biol.* **116**: 113-125
- Baker, E.K., Colley, N.J. and Zuker, C.S.** (1994): The cyclophilin homolog NinaA functions as a chaperone, forming a stable complex *in vivo* with its protein target rhodopsin. *EMBO J.* **13**: 4886-4895
- Berger, R., Schauwecker, F. and Keller, U.** (1999): Transcriptional analysis of the *cypA* gene of *Streptomyces chrysomallus*. *FEMS Microbiol. Let.* (**178**): 39-45
- Bibb, M.J., Findlay, P.R. and Johnson, M.W.** (1984): The relationship between base composition and codon usage in bacterial genes and its use for the single and reliable identification of protein-coding sequences. *Gene* **30**: 157-166
- Blanco, J., Coque, J.J. and Martin J.F.** (1996): Characterization of the *secA* gene of *Streptomyces lividans* encoding a protein translocase which complements an *Escherichia coli* mutant defective in the ATPase activity of SecA. *Gene* **176**: 61-65
- Bourquin, J.P., Stagljar, I., Meier, P., Moosmann, P., Silke, J., Baechi, T., Georgiev, O. and Schaffner, W.A.** (1997): Serine/arginine-rich nuclear matrix cyclophilin interacts with the C-terminal domain of RNA polymerase II. *Nucleic Acids Res.* **25**: 2055-2061
- Bradford, M.M.** (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 255-260
- Brosius, J.** (1989): Superpolylinkers in cloning and expression vectors. *DNA* **8**: 759-777
- Brown, E.J., Albers, M.W., Shin, T.B., Ichikawa, K., Keith, C.T., Lane, W.S. and Schreiber S.L.** (1994): A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin-receptor complex. *Nature* **369**: 756-758
- Bucca, G., Ferina, G., Puglia, A.M. and Smith, C.P.** (1995): The *dnaK* operon of *Streptomyces coelicolor* encodes a novel heat-shock protein which binds to the promoter region of the operon. *Mol. Microbiol.* **17**: 663-674
- Bush, K.T., Hendrickson, B.A. and Nigam, S.K.** (1994): Induction of the FK506-binding protein, FKBP13, under conditions which misfold proteins in the endoplasmic reticulum. *Biochem. J.* **303**: 705-708
- Callebaut, I. and Moron, J.-P.** (1995): Trigger factor, one of the *Escherichia coli* chaperone proteins, is an original member of the FKBP family. *FEBS Letters* **374**: 211-215
- Cameron, A.M., Nucifora, F.C. Jr., Fung, E.T., Livingston, D.J., Aldape, R.A., Ross, C.A. and Snyder, S.H.** (1997): FKBP12 binds the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor at leucine-proline (1400-1401) and anchors calcineurin to this FK506-like domain. *J. Biol. Chem.* **272**: 27582-27588
- Chen, Y.G., Liu, F. and Massague, J.** (1997): Mechanism of TGF β receptor inhibition by FKBP12. *EMBO J.* **16**: 3866-3876
- Cheng, J., Guffanti, A.A. and Krulwich, T.A.** (1997): A two-gene ABC-type transport system that extrudes Na⁺ in *Bacillus subtilis* is induced by ethanol or protonophore. *Mol. Microbiol.* **23**: 1107-1120
- Cianciotto, N.P. and Fields, B.S.** (1992): *Legionella pneumophila* mip gene potentiates intracellular infection of protozoa and human macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89**: 5188-5191
- Ciancotto, N., Eisenstein, B.I., Mody, C.H., Toews, G.B. and Engelberg, N.C.** (1989): A *Legionella pneumophila* gene encoding a species-specific surface protein potentiates initiation of intracellular infection. *Infect. Immun.* **57**: 1255-1262
- Cruz, M.C., Cavallo, L.M., Gorlach, J.M., Cox, G., Perfect, J.R., Cardenas, M.E. and Heitman, J.** (1999): Rapamycin antifungal action is mediated via conserved complexes with FKBP12 and TOR kinase homologs in *Cryptococcus neoformans*. *Mol. Cell. Biol.* **19**: 4101-4112
- Dartigalongue, C. and Raina, S.** (1998): A new heat-shock gene, *ppiD*, encodes a peptidyl-prolyl isomerase required for folding of outer membrane proteins in *Escherichia coli*. *EMBO J.* **17**: 3968-3980
- David, M., Lubinsky-Mink, S., Ben-Zvi, A., Suissa, M., Ulitzur, S. and Kuhn, J.** (1991): Citrate synthase from *Mycobacterium smegmatis*. Cloning, sequence determination and expression in *Escherichia coli*. *Biochem. J.* **278**: 225-234

- DeFranco, D.B., Ramakrishnan, C. and Tang, Y.** (1998): Molecular chaperones and subcellular trafficking of steroid receptors. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* **65**: 51-58
- del Moral, R.G., Olmo, A., Aguilar, M. and O'Valle, F.** (1998): P glycoprotein: a new mechanism to control drug-induced nephrotoxicity. *Exp. Nephrol.* **6**: 89-97
- Dhandayuthapani, S., Zhang, Y., Mudd, M.H. and Deretic, V.** (1996): Oxidative stress response and its role in sensitivity to isoniazid in mycobacteria: characterization and inducibility of *ahpC* by peroxides in *Mycobacterium smegmatis* and lack of expression in *M. aureum* and *M. tuberculosis*. *J. Bacteriol.* **178**: 3641-3649
- Dolinski, K., Muir, S., Cardenas, M. and Heitman, J.** (1997): All cyclophilins and FK506 binding proteins are, individually and collectively, dispensable for viability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 13093-13098
- DSM-Katalog** (1993): Catalogue of Strains 1993. Edition 5, Braunschweig.
- Duina, A.A., Chang, J.H.-C., Marsh, J.A., Lindquist, S and Gaber, R.F.** (1996): A cyclophilin function in HSP90-dependent signal transduction. *Science* **274**: 1713-1716
- Eikmanns, B.J., Thum-Schmitz, N., Eggeling, L., Ludtke, K.U. and Sahm, H.** (1994): Nucleotide sequence, expression and transcriptional analysis of the *Corynebacterium glutamicum gltA* gene encoding citrate synthase. *Microbiology* **140**: 1817-1828
- Engelberg, N.C., Carter, C., Weber, D.R., Ciancotto, N.P. and Eisenstein, B.I.** (1989): DNA sequence of *mip*, a *Legionella pneumophila* gene associated with macrophage infectivity. *Infect. Immun.* **57**: 1263-1270
- Feinberg, A.P. and Vogelstein, B.** (1983): A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* **132**: 6-13
- Ferreira, P.A., Nakayama, T.A., Pak, W.L. and Travis, G.H.** (1996): Cyclophilin-related protein RanBP2 acts as chaperone for red/green opsin. *Nature* **383**: 637-640
- Fernandes, N.D., Wu, Q., Kong, D., Puyang, X., Garg, S. and Husson. R.N.** (1999): A mycobacterial extracytoplasmatic sigma factor involved in survival following heat shock and oxidative stress. *J. Bact.* **181**: 4266-4274
- Fischer, G., Tradler, T. and Zarnt, T.** (1998): The mode of action of peptidyl prolyl *cis/trans* isomerases in vivo: binding vs. catalysis. *FEBS Lett.* **426**: 17-20
- Fischer, G.** (1994): Über Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen und ihre Effektoren. *Angew. Chem.* **106**: 1479-1501
- Fischer, G., Bang, H., Ludwig, B., Mann, K. and Hacker, J.** (1992): Mip protein of *Legionella pneumophila* exhibits peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerase (PPIase) activity. *Mol. Microbiol.* **6**: 1375-1383
- Fischer, G., Bang, H. and Mech, C.** (1984): Nachweis einer Enzymkatalyse für die *cis-trans*-Isomerisierung der Peptidbindung in prolinhaltigen Peptiden. *Biomed. Biochem. Acta* **43**: 1101-1111
- Fischer, G., Heins, J. and Barth, A.** (1983): The conformation around the peptide bond between the P1- and P2 positions is important for catalytic activity of some proline-specific proteases. *Biochim. Biophys. Acta* **742**: 452-462
- Fischer, G., Wittmann-Liebold, B., Lang, K., Kiefhaber, T. and Schmid, F.X.** (1989): Cyclophilin and peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase are probably identical proteins. *Nature* **337**, 476 - 478
- Franke, E.K., Yuan, H.E.H. and Luban, J.** (1994): Specific incorporation of cyclophilin A into HIV virions. *Nature* **372**: 359-362
- Galat, A. and Metcalfe, S.M.** (1995): Peptidylproline *cis/trans* isomerases. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **63**: 67-118
- Gill, S.C. and von Hippel, P.H.** (1989): Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal. Biochem.* **182**: 319-326
- Goebel, M. and Yanagida, M.** (1991): The TRP snap helix: a novel protein repeat from mitosis to transcription. *Trends Biochem. Sci.* **16**: 173-177
- Göthel, S.F. and Marahiel, M.A.** (1999) Peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerases, a superfamily of ubiquitous folding catalysts. *Cell. Mol. Life Sci.* **55**: 423-436
- Göthel, S.F., Schmid, R., Wipat, A., Carter, N.M., Emmerson, P.T., Harwood, C.R. and Marahiel, M.A.** (1997): An internal FK506-binding domain is the catalytic core of the prolyl isomerase activity associated with the *Bacillus subtilis* trigger factor. *Eur. J. Biochem.* **244**: 59-65
- Gräfe U.** (1992): Biochemie der Antibiotika, Struktur-Biosynthese-Wirkmechanismus. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, New York

- Guthrie, B. and Wickner, W.** (1990): Trigger factor depletion or overexpression causes defective cell division but does not block protein export. *J. Bacteriol.* **172**: 5555-5562
- Haandrikman, A.J., Kok, J., Laan, H., Soemitro, S., Ledebor, A.M., Konings, W.N. and Venema, G.** (1991): Identification of a gene required for maturation of an extracellular lactococcal serine proteinase. *J. Bacteriol.* **171**: 2789 - 2794
- Hanahan, D. and Meselson, M.** (1983): Plasmid screening at high colony density. *Methods Enzymol.* **100**: 333-42
- Handsbumacher, R.E., Harding, M.W., Rice, J., Drugge, R.J. and Speicher, D.W.** (1984): Cyclophilin: A specific cytosolic binding protein for cyclosporin A. *Science* **226**: 544-547
- Hani, J., Schelbert, B., Bernhardt, A., Domdey, H., Fischer, G., Wiebauer, K. and Rahfeld, J.U.** (1999): Mutations in a peptidylprolyl-cis/trans-isomerase gene lead to a defect in 3'-end formation of a pre-mRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **274**: 108-116
- Harding, M.W., Galat, A., Uehling, D.E. and Schreiber S.L.** (1989): A receptor for the immunosuppressant FK506 is a cis-trans peptidyl-prolyl isomerase. *Nature* **341**: 758-760
- Heitman, J., Movva, N.R. and Hall, M.N.** (1991): Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant paramycin in yeast. *Science* **253**: 905-909
- Herrler, M., Bang, H. and Marahiel, M.A.** (1994): Cloning and characterization of *ppiB*, a *Bacillus subtilis* gene which encodes a cyclosporin A-sensitive peptidyl-prolyl cis-trans isomerase. *Mol. Microbiol.* **11**: 1073-1083
- Hesterkamp, T., Hauser, S., Lütcke, H. and Bukau, B.** (1996): *Escherichia coli* trigger factor is a prolyl isomerase that associates with nascent polypeptide chains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 4437-4441
- Higgins, D.G., Bleasby, A.J. and Fuchs, R.** (1991) CLUSTAL V: improved software for multiple sequence alignment. *CABIOS* **8**:189-191
- Hochuli, E., Döbli, H. and Schacher, A.** (1987): New metal chelate adsorbants selective for proteins and peptide containing neighbouring histidine residues. *J. Chromatogr.* **411**: 177-184
- Hoffmann, K. and Handsbumacher, R.E.** (1995): Cyclophilin-40: evidence for a dimeric complex with Hsp90. *Biochem. J.* **307**: 5-8
- Hopwood, D.A., Bibb, M.J., Chater, K.F., Kieser, T., Bruton, C.J., Kieser, H.M., Lydiate, D.J., Smith, C.P., Ward, J.M. and Schrempf, H.** (1985): Genetic manipulation of *Streptomyces*. A laboratory manual. The John Innes Foundation, Norwich
- Hottenrott, S., Schumann, T., Pluckthun, A., Fischer, G. and Rahfeld, J.U.** (1997): The *Escherichia coli* SlyD is a metal ion-regulated peptidyl-prolyl cis/trans-isomerase. *J. Biol. Chem.* **272**: 15697-15701
- Howard, K.S., McLean, P.A., Hansen, F.B., Lemley, P.V., Koblan, K.S. and Orme-Johnson, W.H.** (1986): *Klebsiella pneumoniae* *nifM* gene product is required for stabilisation and activation of nitrogenase iron protein in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **261**: 772-778
- Hunter, T.** (1998): Prolyl isomerase and nuclear function. *Cell* **92**: 141-143
- Hutchinson, R.C.** (1988): The impact of genetic engineering on the commercial production of antibiotics by *streptomyces* and related bacteria. *Appl. Biochem. and Biotech.* **16**: 169-189
- Jacobs, M., Anderson, J.B., Kontinen, V.P. and Sarvas, M.** (1993): *Bacillus subtilis* PrsA is required *in vivo* as an extraplastic chaperone for secretion of active enzymes synthesized either with or without prosequences. *Mol. Microbiol.* **8**: 957-966
- Jayaraman, T., Brillantes, A.M., Timerman, A.P., Fleischer, S.M., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. and Marks, A.R.** (1992): FK506 binding protein associated with the calcium release channel (ryanodine receptor). *J. Biol. Chem.* **267**: 9474-9477
- Kanai, S., Kikuno, R., Toh, H. Ryo, H and Todo, T.** (1997): Molecular evolution of the photolyase-blue-light photoreceptor family. *J. Mol. Evol.* **45**: 535-548
- Kandror, O., Sherman, M., Rhode, M. and Goldberg, A.L.** (1995): Trigger factor is involved in GroEL-dependent protein degradation in *Echerichia coli* and promotes binding of GroEL to unfolded proteins. *EMBO J.* **23**: 6021-6027
- Kato, R., Hasegawa, K., Hidaka, Y., Kuramitsu, S. and Hoshino, T.** (1997): Characterization of a thermostable DNA photolyase from an extremely thermophilic bacterium, *Thermus thermophilus* HB27. *J. Bacteriol.* **179**: 6499-6503
- Katz, E., Thompson, C.J. and Hopwood, D.A.** (1983): Cloning and expression of the tyrosinase gene from *Streptomyces antibioticus* in *Streptomyces lividans*. *J. Gen. Microbiol.* **129**: 2703-2714

- Kay, J.E.** (1996): Structure-function relationships in the FK506-binding (FKBP) family of peptidylprolyl *cis-trans* isomerases. *Biochem. J.* **314**: 361-385
- Keller, U., Kregel, U. and Haese, A.** (1985). Genetic analysis in *Streptomyces chrysomallus*. *J. Biol. Chem.* **131**: 1181-1191.
- Kim, S.T. and Sancar, A.** (1993): Photochemistry, photophysics, and mechanism of pyrimidine dimer repair by DNA photolyase. *Photochem. Photobiol.* **57**: 895-904
- Klappa, P., Freedman, R.B. and Zimmermann, R.** (1995): Protein disulphide isomerase and a luminal cyclophilin-type peptidyl prolyl *cis-trans* isomerase are in transient contact with secretory proteins during late stages of translocation. *Eur. J. Biochem.* **232**: 755-764
- Kleerebezem, M., Heutnik, M. and Tommassen, J.** (1995): Characterization of an *Escherichia coli* *rotA* mutant, affected in periplasmic peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase. *Mol. Microbiol.* **18**: 18313-18320
- Kobayashi, T., Takao, M., Oikawa, A. and Yasui, A.** (1989): Molecular characterization of a gene encoding a photolyase from *Streptomyces griseus*. *Nucleic Acids Res.* **17**: 4731-44
- Kontinen, V.P. and Sarvas, M.** (1993): The PrsA lipoprotein is essential for protein secretion in *Bacillus subtilis* and sets a limit for high-level secretion. *Mol. Microbiol.* **8**: 727-737
- Kops, O., Eckerskorn, C., Hottenrott, S., Fischer, G., Mi, H. and Tropschug, M.** (1998): Ssp1, a site-specific parvulin homolog from *Neurospora crassa* active in protein folding. *J. Biol. Chem.* **273**: 31971-31976
- Korn-Wendisch, F. and Kutzner, H.J.** (1992): The family *Streptomycetaceae*. In *The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications.* (A. Balons, H.G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder, and K.H. Schleifer, eds. New York: Springer Verlag), pp. 921-995
- Krevella, M., Pages, J.M., Pei, Z., Grollier, G., Blaser, M.J. and Fauchere, J.L.** (1993): Isolation and characterization of two *Campylobacter jejuni* glycine-extracted proteins that bind to HeLa cell membranes. *Infect. Immun.* **61**: 3440-3448
- Laemmli, U.K.** (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685
- Lam, E., Martin, M. and Wiederrecht, G.** (1995): Isolation of a cDNA encoding a novel human FK506-binding protein homolog containing leucine zipper and tetratricopeptide repeat motifs. *Gene* **160**: 297-302
- Lam, E., Martin, M.M., Timmerman, A.P., Sabers, C., Fleischer, S., Lukas, T., Abraham, R.T., O'Keefe, S.J., O'Neill, E.A. and Wiederrecht, G.J.** (1995): A novel FK506 binding protein can mediate the immunosuppressive effects of FK506 and is associated with the cardiac ryanodine receptor. *J. Biol. Chem.* **270**: 26511-26522
- Lazar, S.W., Almiron, M., Tormo, A. and Kolter, R.** (1998): Role of the *Escherichia coli* SurA protein in stationary-phase survival. *J. Bacteriol.* **180**: 5704-5711
- Lazar, S.W. and Kolter, R.** (1996): SurA assist the folding of *Escherichia coli* outer membrane proteins. *J. Bacteriol.* **178**: 1770-1773
- Levenson, J.D. and Ness, S.A.** (1998): Point mutations in v-Myb disrupt a cyclophilin-catalyzed negative regulatory mechanism. *Mol. Cell.* **1**: 203-211
- Liu, J., Farmer, J.D., Friedman W.S., Weissman, L.J. and Schreiber, S.L.** (1991): Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell* **66**: 807-815
- Lopez-Illasaca, M., Schiene, C., Kullertz, G., Tradler, T., Fischer, G. and Wetzker, R.** (1998): Effects of FK506-binding protein 12 and FK506 on autophosphorylation of epidermal growth factor receptor. *J. Biol. Chem.* **273**: 9430-9434
- Luban, J.** (1996): Absconding with the chaperone: essential cyclophilin-Gag interaction in HIV-1 virions. *Cell* **87**: 1157-1159
- Luban, J., Bossolt, K.L., Franke, E.K., Kalpana, G.V. and Goff, S.P.** (1993): Human immunodeficiency virus type 1 gag protein binds to cyclophilins A and B. *Cell* **73**: 1067-1078
- Lundemose, A.G., Kay, J.E. and Pearce, J.H.** (1993): *Chlamydia trachomatis* Mip-like protein has peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerase activity that is inhibited by FK506 and rapamycin and is implicated in initiation of chlamydial infection. *Mol. Microbiol.* **7**: 777-783
- Laupacis, A., Keown, P.A., Ulan, R.A., McKenzie, N. and Stiller, C.R.** (1982): Cyclosporin A: a powerful immunosuppressant. *Can. Med. Assoc. J.* **126**: 1041-1046
- Maleszka, R., Hanes, S.D., Hackett, R.L., DeCouet, H.G. and Miklos, G.L.G.** (1996): The *Drosophila melanogaster* dodo (*dod*) gene conserved in humans, is funktionally interchangeable with the ESS1 cell division gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 447-451

- Mayerl, F., Piret, J., Kiener, A., Walsh, T. and Yasui, A. (1990): Functional expression of 8-hydroxy-5-deazafavin-dependent DNA photolyase from *Anacystis nidulans* in *Streptomyces coelicolor*. J. Bact. **172**: 6061-6065
- Mead, D. A., Szczesna-Skoruopa, E. and Kemper, B. (1988): Single stranded DNA blunt T7 promoter plasmids: a versatile tandem promoter system for cloning and protein engineering. *Protein Engin.* **1**: 67-74
- Missiakas, D., Betton, J.M. and Raina, S. (1996): New components of protein folding in extracytoplasmic compartments of *Escherichia coli* SurA, FkpA and Skp/OmpH. Mol. Microbiol. **21**: 871-884
- Mizrahi, V. and Andersen, S.J. (1998): DNA repair in *Mycobacterium tuberculosis*. What have we learnt from the genome sequence? Mol. Microbiol. **29**: 1331-1339
- Montague, J.W., Hughes, F.M. Jr. and Cidlowski, J.A. (1997): Native recombinant cyclophilins A, B, and C degrade DNA independently of peptidylprolyl cis-trans-isomerase activity. Potential roles of cyclophilins in apoptosis. J. Biol. Chem. **272**:6677-6684
- Moore, J., Engelberg, A. and Bairoch, A. (1988): Using PC/GENE for protein and nucleic acid analysis. BioTechniques **6**: 566-572
- Morelle, G. (1989): A plasmid extraction procedure an a miniprep scale. Focus **11**: 1.
- Morrison, D.A. (1977): Transformation in *Escherichia coli*: cryogenic preservation of competent cells. J. Bacteriol. **132**: 349-351
- Muth, G., Nußbauer, B., Wohlleben, W. and Pühler, A. (1989): A vector sysem with temperature-sensitive replication for gene disruption and mutational cloning in streptomycetes. Mol. Gen. Genet. **291**: 341-348
- Nair, S.C., Rimerman, R.A., Toran, E.J., Chen, S., Prapapanich, V., Butts, R.N. and Smith, D.F. (1997): Molecular cloning of human FKBP51 and comparisons of immunophilin interactions with Hsp90 and progesterone receptor. Mol. Cell. Biol. **17**: 594-603
- Nakamura, T., Yabe, D., Kanazawa, N., Tashiro, K., Sasayama, S. and Honjo, T. (1998): Molecular cloning, characterization, and chromosomal localization of FKBP23, a novel FK506-binding protein with Ca²⁺-binding ability. Genomics **54**: 89-98
- Nicolas, K.B. and Nicolas, B. Jr. (1997): GenDoc; a tool for editing and annotating multiple sequence alignments.
- Peatty, D.A., Harding, M.W., Fleming, M.A., DeCenzo, M.T., Lippke, J.A., Livingston, D.J. and Benasutti, M. (1992): Expression and characterization of human FKBP52, an immunophilin that associates with the 90-kDa heat shock protein and is a component of steroid receptor complexes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **89**: 10974-10978
- Pahl, A. and Keller, U. (1992): FK-506-binding proteins from streptomycetes producing immunosuppressive macrolactones of the FK-506 type. J. Bacteriol. **174**: 5888-5894
- Pahl, A. and Keller, U. (1994): *Streptomyces chrysomallus* FKBP-33 is a novel immunophilin consisting of two FK506 binding domains; its gene is transcriptionally coupled to the FKBP-12 gene. EMBO J. **13**: 3472-3480
- Pahl, A., Gewies, A. and Keller, U. (1997): ScCypB is a novel second cytosolic cyclophilin from *Streptomyces chrysomallus* which is phylogenetically distant from ScCypA. Microbiology **143**: 117-126
- Pearson, W. R. and Lipman, D. J. (1988): Improved tools for biological sequence comparison. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **85**: 2444-2448
- Pedersen, K.M., Finsen, B., Celis, J.E. and Jensen, N.A. (1999): muFKBP38: a novel murine immunophilin homolog differentially expressed in Schwannoma cells and central nervous system neurons *in vivo*. Electrophoresis **20**: 249-255
- Peterson, R.T., Desai, B.N., Hardwick, J.S. and Schreiber, S.L. (1999): Protein phosphatase 2A interacts with the 70-kDa S6 kinase and is activated by inhibition of FKBP12-rapamycinassociated protein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **96**: 4438-4442
- Ping, L.K., Hanes, S.D. and Hunter, T. (1996): A human peptidyl-prolyl isomerase essential for regulation of mitosis. Nature **380**: 544-547
- Pschyrembel, W. (1994): Klinisches Wörterbuch. **257**. Auflage, Walter de Gryter, Berlin
- Qi, Y., Ogunbunmi, E.M., Freund, E.A., Timerman, A.P. and Fleischer, S. (1998): FK-binding protein is associated with the ryanodine receptor of skeletal muscle in vertebrate animals. J. Biol. Chem. **273**: 34813-34819
- Rahfeld, J.U., Rücknagel, K.P., Schelbert, B., Ludwig, B., Häcker, J., Mann, K. and Fischer, G. (1994): Confirmation of the existence of a third family among peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerases Amino acid sequence and recombinant production of parvulin. FEBS Letters **352**: 180-184

- Rahfeld, J.U., Schierhorn, A., Mann, K., Fischer, G.** (1994): A novel peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerase from *E. coli*. *FEBS Letters* **343**: 65-69
- Ranganathan, R., Lu, K.P., Hunter, T. and Noel, J.P.** (1997): Structural and functional analysis of the mitotic rotamase Pin1 suggests substrate recognition is phosphorylation dependent. *Cell* **89**: 875-886
- Redenbach, M., Kieser, H.M., Denapaite, D., Cullum, J., Kinashi, H. and Hopwood, D.A.** (1996): A set of ordered cosmids and detailed genetic and physical map for coelicolor A3(2) chromosome. *Mol. Microbiol.* **21**: 77-96
- Renoir, J.M., Pahl, A., Keller, U. and Baulieu, E.E.** (1993): Immunological identification of a 50 kDa Mr FK506-binding immunophilin as a component of the non-DNA binding, hsp90 and hsp70 containing, heterooligomeric form of the chick oviduct progesterone receptor. *CR. Acad. Sci.* **316**:1410-1416
- Rouviere, P.E. and Gross, C.A.** (1996): SurA, a periplasmic protein with peptidyl-prolyl isomerase activity, participates in the assembly of outer membrane porins. *Genes Dev.* **10**: 3170-3182
- Sabatini, D.M., Erdjument-Bromage, H., Lui, M., Tempst, P. and Snyder, S.H.** (1994): RAFT1: a mammalian protein that binds to FKBP12 in a rapamycin-dependent fashion and is homologous to yeast TORs. *Cell* **78**:35-43
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T.** (1989): *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
- Sancar, A.** (1994): Structure and function of DNA photolyase. *Biochemistry* **33**: 2-9
- Schlegel, H.G.** (1985): *Allgemeine Mikrobiologie*. 6. Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart
- Schleicher & Schuell** (1995): *Blotting, Hybridisation & Detection: An S & S Laboratory Manual*. 6th Edition, Keene
- Schmidt, B., Tradler, T., Rahfeld, J.U., Ludwig, B., Jain, B., Mann, K., Rücknagel, K.P., Janowski, B., Schierhorn, A., Küllertz, G., Hacker, J. and Fischer, G.** (1996): A cyclophilin-like peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerase from *Legionella pneumophila*: characterization, molecular cloning and overexpression. *Mol. Microbiol.* **6**: 1147-60
- Schreiber, S.L. and Crabtree, G.R.** (1992): The mechanism of action of cyclosporin A and FK506. *Immunol. Today* **13**, 136-142
- Sebastian, J., Kraus, B. and Sancar, G.B.** (1990): Expression of the yeast PHR1 gene is induced by DNA-damaging agents. *Mol. Cell. Biol.* **10**: 4630-4637
- Siekierka, J.J., Hung, S.H.Y., Poe, M., Lin, C.S. and Sigal, N.H.** (1989): A cytosolic binding protein for the immunosuppressant FK506 has peptidyl-prolyl isomerase activity but is distinct from cyclophilin. *Nature* **341**: 755-757
- Silverstein, A.M., Galigniana, M.D., Chen, M.S., Owens-Grillo, J.K., Chinkers, M. and Pratt, W.B.** (1997): Protein phosphatase 5 is a major component of glucocorticoid receptor/hsp90 complexes with properties of an FK506-binding immunophilin. *J. Biol. Chem.* **272**: 16224-16230
- Stoller, G., Rücknagel, K.P., Nierhaus, K.H., Schmid, F.X., Fischer, G. and Rahfeld, J.-U.** (1995): A ribosome-associated peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerase identified as the trigger factor. *EMBO J.* **14**: 4939-4948
- Strohl, W. R.** (1992): Compilation and analysis of DNA sequences associated with apparent streptomycete promoters. *Nucleic Acids Res.* **20**: 961-974
- Sudol, M., Chen, H.I., Bougeret, C., Einbond, A. and Bork, P.** (1995): Characterisation of a novel protein-binding module - the WW domain. *FEBS Letters* **369**: 67-71
- Tai, P.-K., Alberts, M.W., Chang, H., Faber, L.E. and Schreiber, S.L.** (1992): Association of a 59-kilodalton immunophilin with the glucocorticoid receptor complex. *Science* **256**: 1315-1318
- Teigelkamp, S., Achsel, T., Mundt, C., Göthel, S.F., Cronshagen, U., Lane, W.S. and Marahiel, M.A.** (1997): The 20kD protein of human [U4/U6.U5] tri-snRNPs is a novel cyclophilin that forms a complex with the U4/U6-specific 60kD and 90kD proteins. *RNA* **4**: 127-41
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J.** (1994): CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**: 4673-4680
- Timberlake, W.E.** (1986): Isolation of stage- and cell-specific genes from fungi. In Bailey, J. (eds.): *Biology and Molecular Biology in Plant-Pathogen Interactions*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg Vol.H1: pp 343-357
- Timerman, A.P., Ogunbumni, E., Freund, E., Wiederrecht, G., Marks A.R. and Fleischer S.** (1993): The calcium release channel of sarcoplasmic reticulum is modulated by FK-506-binding protein. *J. Biol.Chem.* **268**: 22992-22999

- Tormo, A., Almi3n, M. and Kolter, R.** (1990): SurA, an *Escherichia coli* gene essential for survival in stationary phase. *J. Bacteriol.* **172**: 4339-4347
- Tropschug, M., Barthelmess, I.B. and Neupert, W.** (1989): Sensitivity to cyclosporin A is mediated by cyclophilin in *Neurospora crassa* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* **342**: 953-955
- Uchida, T., Fujimori, F., Tradler, T., Fischer, G. and Rahfeld, J.U.** (1999): Identification and characterization of a 14 kDa human protein as a novel parvulin-like peptidyl prolyl cis/trans isomerase. *FEBS Lett.* **446**: 278-282
- Vos, P., Asseldonk van, M., Jeveren van, F., Siezen, R., Simons, G. and de Vos, W.M.** (1989): A maturation protein is essential for production of active forms of *Lactococcus lactis* SK11 serine proteinase located in or secreted from the cell envelope. *J. Bacteriol.* **171**: 2795-2802
- Walensky, L.D., Gascard, P., Fields, M.E., Blackshaw, S., Conboy, J.G., Mohandas, N. and Snyder, S.H.** (1998): The 13-kD FK506 binding protein, FKBP13, interacts with a novel homologue of the erythrocyte membrane cytoskeletal protein 4.1. *J. Cell. Biol.* **141**: 143-153
- Warth, R., Briand, P.A. and Picard, D.** (1997): Functional analysis of the yeast 40 kDa cyclophilin Cyp40 and its role for viability and steroid receptor regulation. *Biol. Chem.* **378**: 381-391
- Wright, F. and Bibb, M. J.** (1992): Codon usage in the G+C rich *Streptomyces* genome. *Gene* **113**: 55-65.
- Xin, H.B., Rogers, K., Qi, Y., Kanematsu, T. and Fleischer, S.** (1999): Three amino acid residues determine selective binding of FK506-binding protein 12.6 to the cardiac ryanodine receptor. *J. Biol. Chem.* **274**: 15315-15319
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. and Messing, J.** (1985): Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**: 103-119
- Zhao, Y., Chen, Y., Schutkowski, M., Fischer, G. and Ke, H.** (1997): Cyclophilin A complexed with a fragment of HIV-1 gag protein: insights into HIV-1 infectious activity. *Structure* **5**: 139-146
- Zimmermann, R.** (1998): The role of molecular chaperones in protein transport into the mammalian endoplasmic reticulum. *Biol. Chem.* **379**: 175-282

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Horst Kleinkauf und Prof. Dr. Johann Salnikow danke ich für die Möglichkeit meine Dissertation am Institut für Biochemie und molekulare Biologie der Technischen Universität Berlin durchzuführen und zu einem erfolgreichen Abschluß zu bringen.

Ein besonderer Dank gebührt Priv. Doz. Dr. Ullrich Keller. Er verstand es durch sein Interesse an meiner Arbeit und seine Ideen mir jederzeit die nötige Motivation zu geben.

Ich danke vor allem Dr. Florian Schauwecker für die exzellente Einarbeitung in die molekularbiologischen Arbeitstechniken, seine ständige Hilfe bei kniffligen Experimenten sowie für drei Jahre bestes Laborklima.

Ohne Dr. Frank Pfennig wäre der Laboralltag nur die Hälfte wert. Für die gewährte Unterstützung und Diskussionsbereitschaft besonders in der Endphase dieser Arbeit sei ihm an dieser Stelle gedankt.

Gunnar Schröder danke ich für seinen unbändigen Wissendurst, der mir die Möglichkeit gab, täglich das Gelernte weiterzugeben und zu vertiefen. Dank auch für die fruchtbare praktische Zusammenarbeit.

Dipl. Chem. Nicolas Grammel komplettiert als Doktorand das Team. Da wir zeitgleich durch die Promotionszeit gingen, war er für mich trotz einer anderen Thematik auch immer Motivation und Diskussionspartner.

Dr. Helen Kieser, John Innes Centre Norwich, danke ich für das Cosmid Screening und die Bereitstellung der Cosmide.

Dr. Schröder danke ich für die Protein- und Peptidsequenzierung.

Die Photos dieser Arbeit wurden von Fr. Denaro hergestellt. Allen weiteren Mitarbeitern des Instituts vor allen der Arbeitsgruppe von J. Vater und R. Zocher danke ich für die Zusammenarbeit.

Ich danke von ganzem Herzen meiner Freundin Fleur für die Kraft, die Liebe und die Ruhe die sie mir gab. Ohne sie hätte ich möglicherweise nie den Weg nach Berlin gefunden.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern, ohne deren Unterstützung ich heute nicht diesen Satz schreiben würde.

Lebenslauf

Name: Rico Berger

Geburtstag: 05.09.1971

Geburtsort: Wermsdorf

Eltern: Margita Berger
Sekretärin
Hans-Joachim Berger
Werkzeugmacher

Familienstand: ledig

Schulische Ausbildung: 10 Jahre Polytechnische Oberschule (1978-1988)
2 Jahre Erweiterte Oberschule (1988-1990), Abitur

Wehrdienst: 1990-1991

Berufliche Ausbildung: 5 Jahre Studium der Biochemie am Institut für
Biochemie/Biotechnologie der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg (1991-1996)

Diplomarbeit (1995-1996) in der Max Planck
Arbeitsgruppe „Enzymologie der Peptidbindung“
zum Thema: Vergleichende Untersuchungen an den
PPIasen Parvulin und PTF1.
Abschluß des Biochemiestudiums im Juli 1996 mit
Prädikat „Gut“

Seit September 1996 wissenschaftlicher Mitarbeiter am
Institut für Biochemie und molekulare Biologie der
technischen Universität Berlin. Promotion in der
Arbeitsgruppe von PD. Dr. U.Keller.
Voraussichtlicher Abschluß des Promotionsverfahrens
mit dem akademischen Grad Dr. rer. nat. im November
1999

Fremdsprachen: Englisch, Russisch (Grundkenntnisse)

Industrie Praktika: 01.09. 1993 - 06.10. 1993 Bayer Pflanzenschutzzentrum
Monheim Abt. Herbizidforschung
28.02. 1994 - 06.04. 1994 Bayer Pflanzenschutzzentrum
Monheim Abt. Herbizidforschung
25.07. 1994-16.09. 1994 Hoechst AG Frankfurt
Abt. Methodische Projekte/Proteinkristallographie

Liste der Veröffentlichungen

Publikationen

1. Berger, R., Hoffmann, M. and Keller, U. (1998): Molecular analysis of a gene encoding a cell-bound esterase from *Streptomyces chrysomallus*. J. Bacteriol. 180:6396-6399
2. Berger, R., Schauwecker, F. and Keller, U. (1999): Transcriptional analysis of the cyclophilin A gene (*cypA*) of *Streptomyces chrysomallus*: Translation of a leaderless gene. FEMS Microbiol. Lett. 178: 39 -45
3. Berger, R. and Keller, U. (1999): Analysis of a FK506 binding Proteins in fast growing Mycobacteria wich are not present in the slow growing Mycobacteria. (in Vorbereitung)
4. Berger, R. and Keller, U. (1999): Analysis of DNA-Photorepair in *Mycobacterium smegmatis*. (in Vorbereitung)
5. Schröder, G., Berger, R. and Keller, U. (1999): Funktional analysis of the FK506 binding Proteins in *Streptomyces ssp.* (in Vorbereitung)

Konferenzbeiträge

1. Gen disruption and Gen replacement in the FKBP-Gen Cluster of *Streptomyces chrysomallus*. Rico Berger and Ullrich Keller, VAAM Meeting „Biologie der Actinomyceten“ Wuppertal 1997 (Poster)
2. Genetic Characterisation of the CypA-Gen Ccluster of *Streptomyces chrysomallus*. Rico Berger and Ullrich Keller, VAAM Meeting „Biologie der Actinomyceten“ Wuppertal 1997 (Poster)
3. Characterization of an esterase gene linked to the cyclophilin A gen (*sccypA*) from *Streptomyces chrysomallus*. Rico Berger, Matthias Hofmann, Florian Schauwecker, Andreas Pahl and Ullrich Keller, VAAM Meeting „Biologie der Actinomyceten“ Kaiserslautern 1998 (Poster)
4. Analyse des *fkB*-Genlocus aus *Mycobacterium smegmatis*. Rico Berger und Ullrich Keller, VAAM Meeting „Biologie der Actinomyceten“ Dreden 1999 (Poster)
5. Charakterisierung eines DNA-Photoreparatursystems aus *Mycobacterium smegmatis*. Rico Berger und Ullrich Keller, VAAM Meeting „Biologie der Actinomyceten“ Dresden 1999 (Vortrag)
6. Regulation der DNA-Photoreparatur in *Mycobacterium smegmatis*. Rico Berger und Ullrich Keller, Symposium „Mechanismen der Genregulation in Mikroorganismen“ Osnabrück 1999 (Vortrag)